

Adriana Maria Giorgi Barsotti

Efeitos da desidratação sobre a secreção de glicocorticoides e a função imune em sapos

Effects of dehydration on glucocorticoid secretion and immune function in toads

São Paulo

2021

Adriana Maria Giorgi Barsotti

Efeitos da desidratação sobre a secreção de
glicocorticoides e a função imune em sapos

Effects of dehydration on glucocorticoid secretion
and immune function in toads

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

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

São Paulo

2021

Barsotti, Adriana Maria Giorgi

Efeitos da desidratação sobre a secreção de glicocorticoides e a função imune em sapos / Adriana Maria Giorgi Barsotti; orientador Fernando Ribeiro Gomes -- São Paulo, 2021.

116P.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Fisiologia.

1. desidratação. 2. estresse. 3. corticosterona. 4. imunocompetência. 5. animais invasores. I. Gomes, Fernando Ribeiro, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes
Orientador(a)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Rolando Kenworthy Barsotti e
Maria Margarida Giorgi Barsotti.
Ao meu marido e parceiro de vida, Paulo Henrique de Mello, e
aos meus filhos e companheiros, João Barsotti de Mello e
Antônio Barsotti de Mello.*

EPÍGRAFE



Disponível em: <https://br.pinterest.com/pin/300333868901181881/>
Acesso em: 02/12/2020.

AGRADECIMENTOS

É muito difícil colocar no papel todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para esse trabalho. Eu poderia discorrer páginas e mais páginas citando amigos, colaboradores e momentos que fizeram toda a diferença durante o meu doutorado.

Começo agradecendo ao meu orientador, Dr. Fernando Ribeiro Gomes, pela orientação dedicada em todos esses anos, levarei os conhecimentos aprendidos para a vida. Obrigada pela confiança e por me atender, sempre com muita paciência, nos momentos de maior aflição e ansiedade. Suas palavras calmas sempre me ajudaram a “voltar para o eixo” e ver as dúvidas com maior clareza e tranquilidade. Te admiro muito como pessoa e profissional. Gratidão.

Aos meus meninos, primeiramente, meu marido Paulo Henrique de Mello, pela parceria na vida e por ser meu maior incentivador nessa profissão que partilhamos. Obrigada, principalmente, por ser esse paizão e dividir todas as responsabilidades da nossa familinha, nós te amamos muito. Ao meu amigo e filho mais velho, João Barsotti de Mello, pela companhia, ajuda nas coletas de sapos e conversas jurássicas... Ao meu filho mais novo, Antônio Barsotti de Mello, menino sorriso, que chegou trazendo tanta alegria nesse ano (2020) complicado para todos. Não vivo sem vocês!

Aos meus pais, Rolando Kenworthy Barsotti e Maria Margarida Giorgi Barsotti, e meus sogros Inamá de Mello Filho (*in memoriam*) e Maria Cristina de Mello, por sempre acreditarem em mim. Vocês são ótimos pais e, mais ainda, excelentes avós. Obrigada por todo carinho e acolhimento com o João durante minhas ausências nas coletas, confortou demais meu coração de mãe.

As minhas irmãs, Flávia Maria Giorgi Barsotti, Marina Giorgi Barsotti, Andréa Conard Muscat e Érika Gracielle Pinto, minhas melhores amigas. E aos meus cunhados, Thiago Souza e Inamá de Mello Netto. Obrigada por sempre, sempre e sempre estarem comigo!

A Marinalva Rodrigues dos Santos (Bieta) por cuidar de mim e me mimar sempre. Obrigada pelos cafés depois do almoço...

Muita gratidão à Equipe Micuim (Braz Titon Junior, Ronyelle Vasconcelos e Renata Vaz), parceiros pra qualquer hora. Obrigada pelos melhores momentos durante todo meu doutorado. Momentos esses que qualquer pensamento além do presente ia embora...era naquele lugar, naquela hora e com aquela companhia que eu queria estar!

Agradeço muito ao Casal Titon (Braz e Stefanny Titon) pela amizade e colaboração. Vocês foram fundamentais.

As Ecofisiogirls (Camila Olarte, Faride Lamadrid, Bruna Cassettari, Daniela Wilwert, Débora Silva, Renata Vaz, Ronyelle Vasconcelos e Stefane Saruhashi) pela amizade construída. Obrigada pelos cafés, risadas e momentos de descontração na mesa de xadrez e nos “meetings” virtuais durante a pandemia.

Aos amigos do LaCoFE (Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva), Vânia Regina de Assis, Stefanny Christie Monteiro Titon, Braz Titon J., Faride Lamadrid, Jessyca Citadini, Carla Bonetti Madelaire, Eduardo Moretti, Aymam Figueiredo, Ronyelle Vasconcelos e Stefane Saruhashi. Obrigada pela companhia nesses anos.

Agradeço aos amigos que fizemos em São Luiz do Paraitinga, em especial ao Benedito dos Santos, obrigada pela amizade e disposição nas coletas. E, também em especial, à Dona Beatriz e “Seu” João Leite, obrigada pelas conversas junto com cafés e bolos nos momentos de cansaço...

Gratidão à Carla Bonetti Madelaire pela companhia e toda ajuda durante minha BEPE. Tivemos muito trabalho, mas também conseguimos ter bons momentos de diversão, o que com certeza facilitou esse tempo longe de casa.

Ao Dr. John Measey pela oportunidade e por me receber tão bem na África do Sul para minha BEPE. Obrigada aos amigos que fiz no Measey Labs: Carla Wagener, Nitya Mohanty, Natasha Kruger e James Baxter-Gilbert.

Aos amigos do LAMEROA e à Profa. Dra. Renata Guimarães Whitton, pela amizade e auxílio.

A todos do Departamento de Fisiologia Geral, especialmente a Roseli Silva Santos, Erika H. Takamoto de Camargo e Catherine Rocha por todo trabalho, dedicação e ajuda com os alunos da pós. Vocês foram fundamentais nessa jornada.

A FAPESP pelo suporte financeiro tanto no Brasil, quanto no estágio no exterior (processos 2016/05024-3 e 2018/23661-6).

Este trabalho foi financiado por:

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

Projeto Temático concedido à CNI (2014/16320-7)

Projeto de Doutorado concedido à AMGB (2016/05024-3)

Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (2018/23661-6)

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	15
CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	21

RESUMO

A maior parte dos anfíbios apresenta alta permeabilidade hídrica e alto risco potencial de estresse hídrico. A desidratação pode representar um estressor, ativando o eixo hipotálamo- hipófise- adrenal/ interrenal (HHA/I), elevando a concentração plasmática de glicocorticoides (GC) e, conseqüentemente, modulando a resposta imune. Embora tenham clara implicação para o valor adaptativo, esses efeitos da desidratação sobre a imunocompetência permanecem pouco explorados na literatura, particularmente para anfíbios anuros. O objetivo dessa tese foi compreender o impacto da desidratação como estressor sobre aspectos da função imune inata em anfíbios anuros. Particularmente, foi investigado se indivíduos de *Rhinella ornata*, espécie de sapo associada a regiões úmidas e florestadas do Brasil, é capaz de ativar uma resposta de estresse quando desidratada, as conseqüências desse estresse hídrico sobre a imunocompetência e a capacidade de resposta a um estressor secundário. O impacto da desidratação como estressor sobre a função imune foi investigado também em populações nativas e invasoras do sapo *Sclerophrys gutturalis* da África do Sul, considerando-se as condições climáticas diferenciadas a que essas populações vivem. Brevemente, indivíduos foram submetidos à desidratação de 10% e 20% da massa corpórea padrão e tiveram amostra de sangue coletada para avaliar variáveis como a concentração plasmática de corticosterona (CORT), hematócrito (HCT), razão neutrófilo: linfócito (N:L), capacidade bactericida plasmática (CBP) e atividade fagocítica de leucócitos (AF). Em seguida, os animais foram submetidos à restrição de movimentos sob condições não-desidratantes (estressor secundário). Nossos resultados mostraram que a desidratação aumentou a CORT, HCT e N:L em sapos. O estresse de restrição secundário resultou em manutenção da concentração elevada de CORT no plasma e aumento da N:L e AF.

Indivíduos de *S. gutturalis* da população invasora mostraram menor índice corpóreo, maior CBP e N:L em campo que indivíduos da população nativa. Após a submissão experimental aos estressores, sapos invasores e nativos mostraram aumento da CORT, e os invasores mantiveram CBP comparativamente maior que os nativos. Esses resultados indicam que a desidratação é um estressor para sapos, sendo capaz de ativar o eixo HHI, aumentando a secreção de CORT e estimulando a função imunitária. Adicionalmente, os sapos invasores apresentam uma função imune inata constitutivamente elevada se comparada à dos nativos, o que poderia aumentar seu valor adaptativo no novo ambiente e favorecer o sucesso de dispersão.

Palavras-chave: Desidratação, estresse, corticosterona, imunocompetência, animais invasores.

ABSTRACT

Among tetrapods, amphibians represent the group with the most permeable skin and the highest risk of water stress. Currently, it is known that dehydration can trigger a stress response in vertebrates, activating the hypothalamus-pituitary-adrenal/interrenal axis (HPA/I), increasing the levels of glucocorticoids (GC) and, consequently, modulating the immune response. Although they have a clear implication for the fitness, these effects of dehydration on immunocompetence remain little explored in the literature, particularly for anuran amphibians. The objective of this thesis was to understand the impact of dehydration as a stressor on aspects of innate immune function in anuran amphibians. Particularly, it was investigated whether individuals of *Rhinella ornata*, a species of toad associated with the mesic and forest regions of Brazil, is able to activate a stress response when dehydrated, the consequences of this water stress on immunocompetence and the ability to respond to a secondary stressor. The impact of dehydration as a stressor on immune function was also investigated in native and invasive populations of the toad *Sclerophrys gutturalis* in South Africa, considering the different climatic conditions in which these populations live. Briefly, individuals were subjected to dehydration of 10% and 20% of standard body mass and had a blood sample collected to assess variables such as plasma corticosterone concentration (CORT), hematocrit (HCT), neutrophil: lymphocyte ratio (N:L), bacterial killing ability (BKA) and phagocytic activity of leukocytes (PP). Then, the animals were submitted to movement restriction under non-dehydrating conditions (secondary stressor). Our results showed that dehydration increased CORT, HCT and N:L in toads. Secondary restriction stress resulted in the maintenance of a high plasma CORT concentration and an increase in N:L and PP. Individuals of *S. gutturalis* from the invasive population showed lower body index, higher BKA and N:L in the field than individuals from the native population. After

experimental submission to stressors, invasive and native toads showed an increase in CORT, and the invaders maintained BKA comparatively higher than the native ones. These results indicate that dehydration is a stressor for toads, being able to activate the HHI axis, increasing the secretion of CORT and stimulating immune function. In addition, invasive toads have a constitutively high innate immune function compared to that of natives, which could increase their fitness in the new environment and favor the success of dispersion.

Keywords: Dehydration, stress, corticosterone, immunocompetence, invasive animals.

INTRODUÇÃO

O tegumento dos vertebrados representa um compromisso evolutivo entre a necessidade de uma proteção mecânica e, ao mesmo tempo, a necessidade de trocar materiais e energia com o ambiente (Lillywhite, 2006). Embora a maior parte dos vertebrados terrestres apresentem queratinas fibrosas que fortalecem o tegumento, anfíbios possuem pouca queratina cutânea e um estrato córneo estreito (Lillywhite, 2006), caracterizando uma pele altamente permeável (Toledo & Jared, 1993). Dessa forma, comparado com outros grupos de tetrápodes, a maioria dos anfíbios apresenta alta taxa de perda evaporativa de água, o que os torna mais propensos ao risco de desidratação. Anfíbios requerem um ambiente úmido para manter as trocas gasosas, cultivar bactérias simbiotas associadas à função imune, proteger seus ovos e realizar suas atividades ecológicas (Duellman & Trueb 1994; Rollins-Smith et al. 2011; Martin & Carter, 2013; Watling & Braga, 2015), e a variação interespecífica em características do balanço hídrico encontra-se associada à disponibilidade de água no ambiente. Espécies que vivem em ambientes mais xéricos, por exemplo, mostram taxas de perda evaporativa de água mais baixas, maiores taxas de absorção de água, e melhor desempenho locomotor quando desidratados do que espécies provenientes de ambientes úmidos e florestados (Titon et al., 2010; Titon & Gomes, 2015; 2017). Em um contexto semelhante, adaptações comportamentais e fisiológicas associadas a condições ambientais mais secas já foram descritas para populações de espécies de anuros invasoras em ambientes mais xéricos que aqueles em que populações nativas são encontradas (Tingley et al., 2012; Kosmala et al., 2017, 2020; Roznik et al., 2018). Tanto o sapo cururu (*Rhinella marina*) na Austrália quanto o sapo gutural (*Sclerophrys gutturalis*) em Cape Town, na África do Sul, mostram maior tolerância à desidratação e melhor desempenho locomotor quando

desidratados do que seus coespecíficos nas regiões nativas e mais úmidas (Kosmala et al., 2017; Vimercati et al., 2018, 2019). Tais características auxiliam a dispersão e aumento populacional no front de invasão.

A submissão a condições dessecantes pode desencadear uma resposta de estresse, elevando a concentração plasmática de glicocorticóides (GC) em diversas espécies de vertebrados (Moeller et al., 2017), incluindo sapos (Barsotti et al., 2019; 2021). Quando estímulos estressores são detectados na amígdala e hipocampo, um sinal neuronal é enviado para o hipotálamo através das catecolaminas epinefrina e norepinefrina. As células neurosecretoras do núcleo paraventricular no hipotálamo secretam o fator liberador de corticotropina (CRF) e arginina vasopressina (AVT), que por sua vez atuam na hipófise estimulando a glândula hipofisária a secretar o hormônio adrenocorticotropico (ACTH). Existem evidências de que outros hormônios também atuem como secretagogos do ACTH, como oxitocina (OT) e mesotocina (MT), no entanto, ainda são esparsas (Romero & Wingfield, 2015). Uma vez que o ACTH foi liberado na corrente sanguínea, ele atinge as células corticosteroidogênicas e se liga aos receptores ligados na membrana estimulando a síntese de corticosteroides (Romero & Wingfield, 2015), resultando em aumento da síntese, secreção e concentração plasmática dos GC, sendo a corticosterona (CORT) o principal GC encontrado em anfíbios. A participação da CORT frente a um evento de desidratação também envolve seu papel mineralotrópico, pois esse hormônio promove a retenção e reabsorção de água na pele, bexiga e rins através do aumento de Na^+ em anfíbios (Uchiyama et al., 2014).

Os GC participam de uma resposta integrada a estressores, modulando várias funções fisiológicas e, dentre estas, as funções imunitárias vem recebendo particular atenção. Os GCs têm amplos efeitos na imunocompetência, incluindo mudanças na atividade de células natural killer, números de células T, produção de linfócitos, anticorpos e citocinas (Marketon &

Glaser, 2008; Fonner et al., 2017). Dado que os GCs alteram o tráfego de leucócitos entre compartimentos, os números e proporções de leucócitos no sangue têm sido comumente utilizados como indicadores de infecção e estresse fisiológico em anfíbios e outros vertebrados (Davis et al., 2008; Campbell, 2015; Savage et al., 2016). Neutrófilos e linfócitos constituem a maioria dos leucócitos sanguíneos em anfíbios e, em resposta a estressores (Bennett & Alspaugh, 1964; Bennett et al., 1972; Turner, 1988; Savage et al., 2016), o número de linfócitos diminui (linfopenia) enquanto o número de neutrófilos circulantes aumenta (neutrofilia), refletindo alterações na distribuição e produção dos leucócitos (Davis et al., 2008; Savage et al., 2016). Os neutrófilos são mobilizados para a corrente sanguínea e tornam-se disponíveis para recrutamento e ativação em locais de inflamação, refletindo um aumento da resposta imunitária em determinados compartimentos (Dhabhar & McEwen, 1996; Dhabhar, 2002).

É importante considerar que os GCs apresentam um efeito bifásico e complexo sobre a imunocompetência, sendo o efeito preponderante dependente de fatores como a intensidade e duração da elevação dos níveis circulantes de GCs e os tipos de receptores ativadas (Dhabhar et al., 1993; 1995; Dhabhar, 2014). Majoritariamente, em resposta a estressores agudos de baixa intensidade, é observado estímulo de diversos aspectos da imunidade, como aumento da apresentação de antígenos, função celular efetora, produção de anticorpos e receptores de citocinas pró-inflamatórias (Dhabhar & McEwen, 1996; Dhabhar & McEwen, 1997). Em contrapartida, a elevação crônica dos GCs tem sido associada a efeitos imunossupressores, os quais incluem inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e estimulação dos fatores anti-inflamatórios (Cain & Cidlowski, 2017), além de atrofia em tecidos linfóides (Sapolsky et al., 2000, Dhabhar, 2014).

Estudos com diferentes protocolos de estresse em anfíbios têm mostrado resultados diversos do papel imunomodulador realizado pela CORT (Gomes et al., 2012; Graham et al., 2012; Narayan et al., 2011; Narayan & Hero, 2014a; 2014b; Assis et al., 2015; 2017; Barsotti et al., 2017; Titon et al., 2018; 2019). A restrição de movimentos é capaz de aumentar a CORT juntamente com efeitos estimulatórios ou supressores da imunidade, variando de acordo com o tempo e intensidade do estressor, bem como do parâmetro imune avaliado. A razão N:L, por exemplo, aumenta após a restrição, mas sua resposta está associada à intensidade do estressor, sendo que o confinamento com restrição de movimentos apresenta um escopo de resposta maior quando comparada com o confinamento sem a restrição de movimentos (Assis et al., 2015). Da mesma forma, a fagocitose é estimulada após a restrição de movimentos (Graham et al., 2012; Assis et al., 2017; Barsotti et al., *dados não publicados*). Por outro lado, embora a capacidade bactericida plasmática (CBP) também mostre estímulo e inibição em diferentes contextos, parece ser uma medida mais robusta, que mantém alta variabilidade interindividual por longos períodos e menor maleabilidade em função de estressores (Assis et al., 2015; 2017; 2019; Barsotti et al., 2017; 2019; Titon et al., 2018; 2019; 2020). Estudos mostram que uma diminuição da CBP foi observada tanto após submissão a estressores agudos quanto de longo-prazo (Graham et al., 2012; Assis et al., 2015; Titon et al., 2017; 2018; 2019).

Diante desse cenário, em que a desidratação eleva os níveis de GCs e estes atuam sobre aspectos imunitários, parece lógico esperar que o estado hídrico poderia ter considerável impacto sobre a função imune (Brush & DeNardo, 2017). Porém, a relação entre desidratação, alterações dos níveis plasmáticos de GCs e imunidade ainda é pobremente explorada. Um estudo em laboratório com o monstro-de-gila (*Heloderma suspectum*) mostrou que, após a desidratação, os animais tiveram um aumento de diferentes aspectos da

imunidade inata (lise e aglutinação, CBP e perfil leucocitário), porém, sem elevação significativa dos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) (Moeller et al., 2017). Outro estudo, realizado com cascavel (*Crotalus atrox*), também mostrou um aumento de funções imunitárias (lise e aglutinação e atividade antimicrobiana plasmática) após a desidratação (Brush & DeNardo, 2017). Vale destacar que essas duas espécies (*H. suspectum* e *C. atrox*) experimentam em seu hábitat natural um período de seca pronunciado durante o ano (Moeller et al., 2017; Brush & DeNardo, 2017), e talvez animais adaptados a estas condições mostrem menor sensibilidade à desidratação, aumentando sua resposta imune sem elevar os níveis de GCs em resposta a esse estímulo. Por outro lado, talvez animais que habitam regiões méxicas apresentem uma resposta de estresse mais pronunciada quando desidratados, elevando os níveis de GCs e suprimindo a imunidade, tornando o animal mais vulnerável a doenças. No entanto, estudos relacionando estado hídrico e imunidade em animais de ambientes tropicais méxicos ainda são escassos.

Rhinella ornata mostra ser um bom modelo para estudos sobre estresse hídrico em espécies de ambiente méxico, uma vez que apresenta uma distribuição geográfica associada a ambientes florestados e bordas de mata (Kloss, 1972; Jim, 1980; Baldissera et al., 2004; Titon et al., 2010). No capítulo I (*Dehydration as a stressor in toads [Rhinella ornata]*) e II (*Dehydration followed by a secondary stressor sustains high circulating corticosterone and improves immunity in toads*) investigamos se a desidratação é um estressor para essa espécie, sendo capaz de ativar o eixo HHI e aumentar a CORT. Adicionalmente, avaliamos a responsividade a um estressor secundário (restrição de movimentos) e aspectos da imunidade de sapos *R. ornata* exibindo diferentes níveis de desidratação.

Espécies invasoras também se mostram interessantes como sistema de observação de ajustes fisiológicos rápidos à ocupação de ambientes climaticamente distintos. No capítulo

III (*Challenges of a novel range: water balance, stress and immunity in an invasive toad*) da presente tese, investigamos a resposta ao estresse e seus efeitos na imunocompetência de indivíduos nativos e invasores de *Sclerophrys gutturalis*, também apresentando diferentes níveis de desidratação.

CONCLUSÕES

A exposição das duas espécies de sapos estudadas, *R. ornata* e *S. gutturalis*, a diferentes níveis de desidratação (10 % e 20% da massa corpórea padrão) resultou em aumento correspondente da concentração plasmática de corticosterona (CORT). Esse resultado foi observado inclusive para indivíduos da população invasora de *S. gutturalis*, os quais demonstram ser mais resistentes ao estresse hídrico. Dessa forma, a desidratação representa um estressor para esses anuros, com intensidade de resposta variável e dependente de intensidade do estressor.

A exposição de indivíduos de *R. ornata* à restrição de movimentos (em condições não desidratantes) após a desidratação resultou na manutenção da concentração elevada de CORT plasmática e refletiu em aumento da razão neutrófilo: linfócito (N:L) e atividade fagocítica (AF). Sendo assim, a submissão desses sapos a dois estressores agudos de forma consecutiva gerou uma resposta de estresse sustentada e um efeito imunoestimulador. Vale ressaltar que esses resultados são pertinentes à submissão consecutiva a dois estressores agudos e que, talvez, a submissão inicial a um estressor crônico antes do agudo secundário pudesse gerar resultados diferentes, como uma imunossupressão.

Com relação a *S. gutturalis*, indivíduos da população invasora mostraram maior capacidade bactericida plasmática (CBP) e N:L em campo, e mantiveram a CBP maior após

a submissão aos estressores (desidratação seguida de restrição de movimentos) quando comparados com indivíduos da população nativa. Esses resultados indicam que sapos invasores apresentam funções imunitárias constitutivamente elevadas, o que poderia conferir vantagens de ajustes às condições climáticas prevalentes no ambiente recentemente ocupado.

Dado que as populações de anfíbios vêm sofrendo um declínio acentuado, principalmente devido às mudanças climáticas, fragmentação e perda de habitat, as quais expõem os anfíbios a um maior risco de dessecação, entender como a desidratação pode modular a resposta a estressores e a imunocompetência se tornou uma questão imprescindível a ser investigada. Estudos futuros, envolvendo a desidratação e exposição a estressores crônicos, bem como estudos comparativos de animais de diferentes biomas, seriam interessantes para dar continuidade ao entendimento dessas relações.

Referências

- 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.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Queiroz-Hazarbassanov, N.G.T., Massoco, C.O., Gomes, F. R., 2017. Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): Effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. J. Exp. Zool. A. Ecol. Integr. Physiol. 327, 200-213.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Gomes, F.R., 2019. Acute stress, steroid plasma levels, and innate immunity in Brazilian toads. Gen. Comp. Endocrinol. 273, 86-97.
- Baldissera Jr, F.A., Caramaschi, U., Haddad, C.F.B., 2004. Review of *Bufo crucifer* species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro 62 (3), 255–282.
- Barsotti, A.M.G., de Assis, VR., Titon, S.C.M., Junior, B.T., da Silva Ferreira, Z.F., Gomes, F.R., 2017. ACTH modulation on corticosterone, melatonin, testosterone and innate immune response in the tree frog *Hypsiboas faber*. Comp. Biochem. Physiol Part A, 204, 177-184.

- Barsotti, A.M.G., Titon Junior, B., Titon, S.C.M., Gomes, F.R., 2019. Dehydration as a stressor in toads (*Rhinella ornata*). *J. Exp. Zool. Part A* 331, 168–174.
- Barsotti, A. M. G., Madelaire, C. B., Wagener, C., Junior, B. T., Measey, J., Gomes, F. R., 2020. Challenges of a novel range: Water balance, stress, and immunity in an invasive toad. *Comp. Biochem. Physiol.* 253, 1- 11.
- Bennett, M.F. & Alspaugh, J.K., 1964. Some changes in the blood of frogs following administration of hydrocortisone. *Virginia J. Sci.* 15, 76–79.
- Bennett, M.F., Gaudio, C.A., Johnson, A.O., Spisso, J.H., 1972. Changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, following administration of hydrocortisone. *J. Comp. Physiol. A.* 80, 233–237.
- Brusch, G. A. & DeNardo, D. F., 2017. When less means more: dehydration improves innate immunity in rattlesnakes. *J. Exp. Biol.* 220, 2287-2295.
- Cain, D. W. & Cidowski, J. A., 2017. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 233-247.
- Campbell, T., 2015. Exotic animal hematology and cytology. John Wiley & Sons.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S., Spencer, R. L., 1993. Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin levels—a comparison between Sprague-Dawley, Fischer and Lewis rats. *Brain research.* 616, 89-98.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154, 5511-5527.
- Dhabhar, F.S. & McEwen, B.S., 1996. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 156, 2608-2615.
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav. Immun.* 11, 286-306.
- 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., 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* 58, 193-210.
- Duellman, W.E. & Trueb, L., 1994. Biology of amphibians. McGraw-Hill, New York.
- Fonner, C. W., Patel, S. A., Boord, S. M., Venesky, M. D., Woodley, S. K., 2017. Effects of corticosterone on infection and disease in salamanders exposed to the amphibian fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Organ.* 123, 159-171.
- 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. Herpetol.* 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.

- Jim, J., 1980. Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura). São Paulo. 332p. Tese (Doutorado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Kloss, G.R., 1972. Os Rhabdias dos Bufo do grupo marinus: um estudo de espécies crípticas (Nematoda, Rhabditoidea). São Paulo. 90p. Tese (Doutorado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Kosmala, G., Christian, K., Brown, G., Shine, R., 2017. Locomotor performance of cane toads differs between native-range and invasive populations. *R. Soc. Open Sci.* 4, 1–11.
- Kosmala, G.K., Brown, G.P., Shine, R., 2020. Thin-skinned invaders: geographic variation in the structure of the skin among populations of cane toads (*Rhinella marina*). *Biol. J. Linn. Soc.* XX, 1–11.
- Lillywhite, H.B., 2006. Water relations of tetrapod integument. *J. Exp. Biol.* 209, 202–226.
- Marketon J. W. & Glaser, R., 2008. Stress hormones and immune function. *Cell. Immunol.* 252, 16–26.
- Martin, K.L. & Carter, A.L., 2013. Brave new propagules: terrestrial embryos in amniotic eggs. *Integr. Comp. Biol.* 53, 233-247.
- Moeller, K.T., Demare, G., Davies, S., DeNardo, D.F., 2017. Dehydration enhances multiple physiological defense mechanisms in a desert lizard, *Heloderma suspectum*. *J. Exp. Biol.* 220, 2166–2174.
- 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. & Hero, J.M., 2014a. Acute thermal stressor increases glucocorticoid response but minimizes testosterone and locomotor performance in the cane toad (*Rhinella marina*). *PLoS One* 9, e92090. 550 55.
- Narayan, E. & Hero, J.M., 2014b. Repeated thermal stressor causes chronic elevation of baseline corticosterona and suppresses the physiological endocrine sensitivity to acute stressor in the cane toad (*Rhinella marina*). *J. Therm. Biol.* 41, 72–76.
- Rollins-Smith, L. A., Ramsey, J. P., Pask, J. D., Reinert, L. K., Woodhams, D., 2011. Amphibian immune defense against chytridiomycosis: impacts of changing environments. *Integr. Comp. Biol.* 51, 552– 562.
- Romero, L.M., Wingfield, J.C., 2015. *Tempests, Poxes, Predators, and People: Stress in Wild Animals and How they Cope*. Oxford University Press.
- Roznik, E.A., Rodriguez-Barbosa, C.A., Johnson, S.A., 2018. Hydric balance and locomotor performance of native and invasive frogs. *Front. Ecol. Evol.* 6, 159.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.

- Savage, A.E., Terrell, K.A., Gratwicke, B., Mattheus, N.M., Augustine, L., Fleischer, R.C., 2016. Reduced immune function predicts disease susceptibility in frogs infected with a deadly fungal pathogen. *Conserv. Physiol.* 4, 1-11.
- Tingley, R., Greenlees, M.J., Shine, R., 2012. Hydric balance and locomotor performance of an anuran (*Rhinella marina*) invading the Australian arid zone. *Oikos*. 121, 1959–1965.
- Titon Jr, B., Gomes, F.R., 2017. Associations of water balance and thermal sensitivity of toads with macroclimatic characteristics of geographical distribution. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 208, 54-60.
- Titon, S.C.M., Junior, B.T., Assis, V.R., Kinker, G.S., Fernandes, P.A.C.M., Gomes, F.R., 2018. Interplay among steroids, body condition and immunity in response to long-term captivity in toads. *Sci. Rep.* 8, 1-13.
- Turner, R.J., 1988. Amphibians. In Rawley AF, Ratcliffe NA, eds, *Vertebrate Blood Cells*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 129–209.
- Titon, B.J., 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. A.* 156, 129–135.
- Titon, B.J. & Gomes, F.R. 2015. Relation between Water Balance and Climatic Variables Associated with the Geographical Distribution of Anurans. *Plos One*. 137, 1-19.
- Titon, B.J. & Gomes, F. R., 2017. Associations of water balance and thermal sensitivity of toads with macroclimatic characteristics of geographical distribution. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 208, 54-60.
- Titon, S.C.M., Junior, B.T., Assis, V.R., Kinker, G.S., Fernandes, P.A.C.M., Gomes, F.R., 2018. Interplay among steroids, body condition and immunity in response to long-term captivity in toads. *Sci. Rep.* 8, 1-13.
- Titon, S.C M., Titon Jr, B., Barsotti, A.M.G., Gomes, F.R., Assis, V.R., 2019. Time-related immunomodulation by stressors and corticosterone transdermal application in toads. *PloS one*, 14(9), e0222856.
- Titon, S.C.M., Titon Jr, B., Assis, V.R., Vasconcelos-Teixeira, R., Neto, P.G.G., Lima, A.S., Ferreira, L.F., Fernandes, P.A., Gomes, F.R., Markus, R.P., 2020. Hormonal daily variation co-varies with immunity in captive male bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113702.
- Toledo, R.C. & Jared, C., 1993. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 105, 593–608.
- Uchiyama, M., Maejima, S., Wong, M. K. S., Preyavichyapugdee, N., Wanichanon, C., Hyodo, S., Takei, Y., Matuda, K., 2014. Changes in plasma angiotensin II, aldosterone, arginine vasotocin, corticosterone, and electrolyte concentrations during acclimation to dry condition and seawater in the crab-eating frog. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195, 40–46.
- Vimercati, G., Davies, S.J., Measey, J., 2018. Rapid adaptive response to a Mediterranean environment reduces phenotypic mismatch in a recent amphibian invader. *J. Exp. Biol.* 221, 1–9.

- Vimercati, G., Davies, S., Measey, J., 2019. Invasive toads adopt marked capital breeding when introduced to a cooler, more seasonal environment. *Biol. J. Linn. Soc.* 128, 657–671.
- Watling, J. I. & Braga, L., 2015. Desiccation resistance explains amphibian distributions in a fragmented tropical forest landscape. *Landscape Ecol.* 30, 1.