

Adriana Maria Giorgi Barsotti

Modulação dos níveis plasmáticos de  
corticoesterona e imunocompetência em resposta  
ao tratamento exógeno com ACTH em  
*Hypsiboas faber*.

São Paulo  
2014

Adriana Maria Giorgi Barsotti

Modulação dos níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em resposta ao tratamento exógeno com ACTH em *Hypsiboas faber*.

Modulation of plasma corticosterone levels and immunocompetence in response to exogenous treatment with ACTH *Hypsiboas faber*.

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

Orientador: Fernando Ribeiro Gomes

São Paulo  
2014

Barsotti, Adriana Maria Giorgi

Modulação dos níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em resposta ao tratamento exógeno com ACTH em *Hypsiboas faber*.

Número de páginas: 59

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

1. Corticosterona 2. Imunocompetência  
3. Testosterona 4. Melatonina

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

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho João Barsotti Mello,  
que me mostra a cada dia que a felicidade é  
simples e que a vida deve ser vivida.

## EPÍGRAFE

"Todo caminho da gente é resvaloso.

Mas também, cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta!  
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem."

*João Guimarães Rosa*

## AGRADECIMENTOS

É muito difícil colocar no papel todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para esse trabalho. Tenho que seguir uma ordem, porém não significa quem ajudou mais ou menos, todos colaboraram de seu jeito.

Agradeço meu orientador e mestre prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes por me apoiar em todas as fases percorridas durante esse mestrado, principalmente nas fases mais limitantes. Agradeço pelas suas palavras calmas e sábias nos momentos de aflição e ansiedade... Agradeço por compreender que os alunos também tem vida fora do laboratório. Agradeço por me mostrar que todo esforço vale a pena, que todo trabalho realizado e resultado obtido, mesmo não sendo o esperado, são muito importantes. Obrigada por tudo !

Agradeço a Vânia Regina de Assis por todo auxílio prestado, pelas orientações e pela amizade. Junto com a Vânia agradeço o Zuza (Braz Titon Junior) e Stefanny Christie Monteiro Titon pela ajuda nas coletas e pelas madrugadas de trabalho, vocês foram FUNDAMENTAIS, sem vocês não seria possível.

Infinitos agradecimentos aos meus pais, Rolando Kenworthy Barsotti e Maria Margarida Giorgi Barsotti e a minha irmã Flávia Maria Giorgi Barsotti, pessoas das quais me orgulho e tenho como exemplo de vida. Tudo isso só foi possível porque vocês me fizeram uma pessoa de bem e souberam me guiar até aqui. Ensinar-me a não brigar com os problemas e sim resolvê-los, obrigada pelas palavras de animo nos momentos mais difíceis. Obrigada por me ensinarem a construir minha estrada no hoje,

pois o futuro não é o lugar para onde estamos indo, e sim o lugar que estamos construindo.

Agradeço ao meu marido Paulo Henrique de Mello por sempre acreditar em mim, me incentivar e não ter medo de correr atrás do meu sonho. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelo seu companheirismo, pela sua paciência e pelo seu amor. Obrigada, muito obrigada pelo silêncio quando eu reclamava e, obrigada também pelas suas palavras de estímulo quando eu me calava. Nessa jornada, a vitória também é sua! Continuaremos juntos, de mãos dadas nessa vida.

Agradeço ao meu filho, João Barsotti de Mello por me ensinar a importância da vida, por me fazer rir quando queria chorar. Obrigada por ser assim tão especial. Obrigada simplesmente por existir.

Agradeço aos meus irmãos de coração, Afonso Reis, Andréa Conard Muscat, André Giorgi Prevelato, Beatriz Maurício, Carina de Castro Moura, Érika Gracielle Pinto, Inamá de Mello Netto, Marina Giorgi Barsotti, Tatiana Leite, Thiago de Souza e Veridiana Maria Pierazzi Nogueira pela amizade de tantos anos... Obrigada por estarem sempre comigo.

Agradeço a Forem e Bieta por sempre cuidarem muito bem de mim!

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva, Jessyca Citadini, Letícia Regina do Amaral Braga, Skol (Carla Bonetti Madelaire), MaryMary (Mariana Góes), Popetar (Eduardo Hermógenes Moretti), Maya

Maya, Clara Aquino e Bruna Cassetari pelos conselhos, auxílios e descontração dentro e fora do laboratório.

Agradeço ao técnico Eduardo Braga pela grande ajuda em todos os experimentos realizados.

Agradeço a Profa. Dra. Zulma Felisbina da Silva Ferreira pela parceria. Obrigada pelos ensinamentos e enriquecimento no meu trabalho.

Agradeço aos amigos Carlos Jared e Marta Maria Antoniazzi pela amizade, por sempre acreditarem em mim e por terem me guiado por esse caminho. Muito obrigada!

Agradeço as funcionárias do departamento Roseli e Gisele pelo trabalho e competência, vocês ajudaram muito nessa jornada.

Agradeço a diretora do Parque Jardim Botânico de São Paulo, Maria de Fátima Scaf por autorizar a coleta dos animais.

Agradeço aos amigos do LAMEROA (Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos), que desde sempre estiveram comigo, me apoiando e incentivando.



O presente trabalho contou com o apoio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
– CNPq:

Bolsa de estudo (Aluna).

Suporte financeiro para coletas e compra de materiais.

Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo –  
FAPESP:

Projeto Jovem Pesquisador (2006/54699-1).

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.....	12
Abstract.....	14
Introdução.....	16
Metodologia.....	21
Local de coleta, espécie estudada e manutenção em cativeiro.....	21
Tratamento exógeno com ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico).....	22
Experimento controle para Melatonina Ocular.....	23
Amostras de sangue e coleta dos olhos.....	23
Capacidade Bactericida Plasmática (CBP).....	24
Análise dos parâmetros sanguíneos.....	25
Dosagem hormonal.....	27
Análise estatística.....	29
Resultados.....	30
Discussão.....	31
Figuras e Tabelas.....	38
Referências.....	47

Esta dissertação está na forma de artigo científico redigido em português e no formato da revista a que será submetido: “*General and Comparative Endocrinology*”, contendo resumo, introdução, metodologia, resultados e discussão.

## RESUMO

Em resposta a diversos estressores, o hipotálamo de anfíbios secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual estimula a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH, por sua vez, atua na glândula inter-renal estimulando a liberação de glicocorticoides, sendo a corticosterona o principal glicocorticoide em anfíbios. Embora a modulação exercida pelos glicocorticoides de diversas respostas fisiológicas de estresse seja fundamental para a manutenção da homeostase em curto prazo, a ativação muito frequente e/ou prolongada do eixo hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI) pode inibir processos importantes em longo prazo, tais como a reprodução e a imunocompetência e afetar a síntese de melatonina atuando diretamente sobre a pineal. O objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona, testosterona, níveis oculares de melatonina, hematócrito e aspectos imunitários (contagem total de leucócitos e capacidade antimicrobiana plasmática – contra *Escherichia coli*) de machos da perereca *Hypsiboas faber* em resposta à injeção de ACTH, bem como o curso temporal destas respostas. Amostras de sangue e plasma foram obtidas a partir de 30 machos capturados em campo, dentro de 3 minutos da captura. Os animais foram trazidos para o laboratório e, após dois meses, divididos em seis grupos para serem amostrados em três horários distintos 1 h, 3h e 6h após o tratamento. Para cada horário um grupo controle e um grupo experimental foram adicionados, recebendo uma injeção de 105 µL de solução salina ou de solução de ACTH (0,446 µg de ACTH/g de massa corpórea (grupo experimental)). O tratamento com ACTH aumentou significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona e diminuiu os níveis plasmáticos de testosterona bem como os níveis oculares de melatonina após 1 hora. Após 6 h da injeção de ACTH, houve um aumento da porcentagem do hematócrito e dos níveis de melatonina ocular. O

tratamento com ACTH não afetou os aspectos imunitários estudados dentro do intervalo amostrado. Os resultados confirmam o papel da ativação do eixo HHI na inibição da secreção de testosterona e na modulação da secreção de melatonina, embora os possíveis efeitos imunomodulatórios possam se dar em intervalos temporais mais tardios.

Palavras-chave: estresse, corticosterona, testosterona, melatonina, imunocompetência.

## ABSTRACT

In response for several stressors, the amphibian hypothalamus release the corticotrophin release hormone (CRH), which stimulates pituitary to release the adenocorticotrophic hormone (ACTH) in the bloodstream. The ACTH, in your turn, acts in inter renal glands stimulating the glicocorticoids releasing, being the corticosterone the main glicocorticoid in anphibians. While the modulation exercised by the glicocorticoids of diversses physiological responses of the stress is fundamental for de maintainance of homeostasis in short period, the frequent and/or prolonged activation of the hypothamlamus pituitary interrenal axis (HHI) could inhibit important process in long periods, as the reproduction and immunocompetence and affect melatonin synthesis acting directly in pineal gland. The objective of the present study was evaluate possible alterations in plasmatic corticosterone levels, testosterone, eyes melatonin levels, hematocrit and immunity aspects (Total count leucocytes and antimicrobial plasmatic capacity – against *Escherichia coli*) from males of the treefrog *Hypsiboas faber* in response to ACTH injection, as well, the temporal course of these responses. Blood and plasma samples were obtained from the 30 males captured in the field, whitin 3 minutes from the capture. The animals were transferred to the laboratory and, after two months, divided in six groups to be sampled in three different times 1 h, 3 h and 6 h after treatment. For each time one control group and one experimental group were added, receiving one injection of 105  $\mu$ L of saline or ACTH solution (0,446  $\mu$ g de ACTH/g of body mass (experimental group)). The ACTH treatment increase significantly the plasmatic corticosterone levels and decrease the plasmatic testosterone levels, as well, the eye melatonin levels after one hour. After six hours of the ACTH injection, occurred the increase of the hematocrit percentage and the eye melatonin levels. The ACTH treatment did not affect the immunity aspects studied in the sampling

interval. The results confirm the role of the activation on the axis HHI in the inhibition of the testosterone secretion and in the modulation of melatonin secretion, although the possible immunomodulatory effects could happen in temporal intervals later.

**Key-words:** stress, corticosterone, testosterone, melatonin, immunocompetence.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma característica da resposta ao estresse dentre os vertebrados é a liberação de glicocorticóides (Romero, 2004). Em anfíbios, a secreção de corticosterona, o principal glicocorticoide encontrado nessa classe, é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Norris, 2007). Embora a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-inter-renais (HHI) em diversos vertebrados seja fundamental para a modulação de ajustes fisiológicos frente a diversos estressores a curto prazo, a ativação crônica do eixo HHI encontra-se associada a efeitos potencialmente deletérios sobre indivíduos e, conseqüentemente populações, como diminuição das taxas de crescimento, inibição da reprodução e depressão da resposta imunitária (Sapolsky, 2002).

Muitos estudos tem examinado a relação entre estressores crônicos e reprodução, principalmente em roedores. A exposição a esses estressores crônicos leva a uma sobrecarga alostática (McEwen & Wingfield, 2003; Woodley & Lacy, 2010), a qual pode suprimir a reprodução em uma variedade de espécies (Breen & Karsch, 2006; Rivier & Rivest, 1991; Sapolsky, 2002; Tilbrook *et al.*, 2000; Wingfield & Sapolsky, 2003; Woodley & Lacy, 2010). Embora poucos estudos comparados aos de mamíferos estejam sendo realizados (Greenberg & Wingfield, 1987; Guillette *et al.*, 1995; Woodley & Lacy, 2010), trabalhos envolvendo anfíbios e répteis têm observado uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos particularmente elevados de glicocorticoides e os níveis plasmáticos de andrógenos (Guillette *et al.*, 1995; Moore & Jessop, 2003). Um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona e uma concomitante redução dos níveis plasmáticos de testosterona ocorrem em resposta a captura e manuseio em muitas espécies de anfíbios (Leboulenger *et al.*, 1979; Paolucci *et al.*, 1990; Gobbetti & Zerani 1996; Mosconi *et al.*, 2006; Woodley & Lacy 2010; Narayan *et al.*, 2011), bem como a administração de glicocorticóides (Burmeister *et al.*,



2001; Licht *et al.*, 1983; Marler & Ryan, 1996; Orchinik *et al.*, 1982; Leary *et al.*, 2006).

Embora os efeitos imunossupressores da ativação crônica do eixo HHI venham sendo amplamente investigados por décadas, estudos mais recentes vêm demonstrando que a imunomodulação por glicocorticóides pode ser bem mais complexa (Sapolsky *et al.*, 2000). O estresse pode ter um efeito bidirecional sobre a imunidade. Dhabhar e colaboradores (1996) demonstraram que o estresse agudo resulta em uma rápida diminuição no número total de leucócitos no sangue. Entretanto, esta redução no número de leucócitos circulantes encontra-se associada a uma redistribuição dos leucócitos do sangue para outros órgãos do corpo, tendendo a aumentar a resposta imunitária em alguns destes compartimentos. Uma resposta aguda a estressores também se encontra associada a um aumento da apresentação de antígenos, função celular efetora, produção de anticorpos e citocinas (Dhabhar, 1996; Dhabhar & McEwen, 1996; Dhabhar, 1997; Dhabhar & McEwen, 1997). Por outro lado, na resposta a estressores crônicos, os glicocorticóides podem suprimir a maturação, diferenciação e proliferação de todas as células imunes (Sternberg, 2006; Martin, 2009), e disparar a apoptose em células T e B tanto nas fases iniciais quanto nas fases mais tardias (Sapolsky *et al.*, 2000). Portanto, o efeito da resposta ao estresse sobre a imunidade é dependente da intensidade e duração da elevação dos níveis circulantes de glicocorticóides.

Ainda que interações entre a glândula pineal e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sejam bem estabelecidas (Barriga *et al.*, 2002), a natureza dessa relação é ainda pobremente entendida (Lutterschmidt *et al.*, 2004). Atualmente, foi confirmado que o efeito dos glicocorticóides sobre a pineal pode resultar em potenciação, inibição ou mesmo em nenhuma alteração sobre a atividade desta glândula (Fernandes, 2009). Além disso, sabe-se que o cortisol e a melatonina são moduladores químicos de diferentes

processos fisiológicos, ambos os hormônios tendo efeitos imunomodulatórios (Ortega *et al.*, 1996, Rodriguez *et al.*, 1999, Barriga *et al.*, 2002). A síntese e liberação circadiana de melatonina modula a resposta de anticorpos e pode antagonizar alguns dos efeitos imunossupressivos induzidos pela corticosterona, como a proliferação de linfócitos (Maestroni *et al.*, 1986, Rogers *et al.*, 1997, Barriga *et al.*, 2002). Ademais, sob influência de melatonina e concentrações fisiológicas de corticosterona, os macrófagos além de ficarem mais ativos também ficam mais eficientes na ingestão de antígenos (Rodriguez *et al.*, 2001, Barriga *et al.*, 2002). Esses dados apoiam a hipótese que glicocorticoides em baixas concentrações podem estimular a imunidade ao invés de suprimi-la (Ortega, 1994, Sharp & Parry-Billings, 1992, Barriga *et al.*, 2002).

Doenças infecciosas da vida selvagem estão frequentemente associadas com estressores ambientais e antropogênicos, e a patogênese é provavelmente influenciada pela resposta do hospedeiro ao estressor (Daszak *et al.*, 2001, Acevedo-Whitehouse & Duffus, 2009, Dobson & Foufopoulos, 2001, Rachowicz *et al.*, 2005). A resposta ao estresse é de interesse no contexto de doença, pois ela é mediada pelos glicocorticoides que são conhecidos por afetarem a susceptibilidade a infecções (Elenkov & Chrousos, 1999). Compreender como os anfíbios respondem a mudança ambiental, dentre os vertebrados, tornou-se uma questão imperativa devido ao acelerado avanço no declínio populacional que está sendo notado mais recentemente para este grupo (Peterson *et al.*, 2013). Dentre as causas do declínio, vem se destacando, além da destruição do hábitat, a ocorrência de doenças infecciosas em seus hábitats relativamente intocados (Carey *et al.*, 1999). Diversos agentes infecciosos têm sido associados a esse declínio populacional de anfíbios, como 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). A infecção por iridovírus

frequentemente ocorre em áreas impactadas pelo homem (Cunningham *et al.*, 1996). Há evidências também que *Aeromonas hydrophilla* aumente sua taxa de crescimento muitas vezes após a exposição a glicocorticoides, indicando que a virulência dessa bactéria pode ser modulada pelo estado de estresse do anfíbio (Kinney *et al.*, 1999). Adicionalmente, a quitridiomiose apresenta, dentre diversos efeitos fisiológicos, um aumento da concentração plasmática de corticosterona em pererecas (Peterson *et al.*, 2013).

Sabendo-se da importância da resposta ao estresse em anfíbios, e que o ACTH estimula a liberação de corticosterona, o objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona, níveis oculares de melatonina, hematócrito e aspectos imunitários (contagem total de leucócitos e capacidade antimicrobiana plasmática – contra *Escherichia coli*) de machos de *Hypsiboas faber* em resposta à injeção de ACTH, bem como o curso temporal destas respostas. Como controle, o curso temporal da resposta à injeção de solução salina será concomitantemente avaliado. As seguintes hipóteses foram testadas:

- 1) A injeção de ACTH resultará em aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona em um período de 30 a 60 minutos;
- 2) Dado que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenais inibe o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e suprime o comportamento reprodutivo em diversos grupos de vertebrados, esperamos que os níveis plasmáticos de testosterona serão diminuídos em decorrência à injeção de ACTH;
- 3) Atualmente sabe-se que os glicocorticóides administrados em altas concentrações reduzem os níveis plasmáticos de melatonina. Sendo assim, acreditamos que os níveis de melatonina ocular serão mais baixos quando os níveis de corticosterona plasmática encontrarem-se mais elevados;

4) O efeito da resposta ao estresse sobre a imunidade é dependente da intensidade e duração da elevação dos níveis circulantes de glicocorticóides, sendo descritos na literatura como ativadores e/ou supressores da resposta imunitária dependendo de intensidade e duração do estímulo. Assim sendo, esperamos que o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona resulte em uma alteração dos aspectos imunitários avaliados;

5) Sabendo que os níveis de melatonina ocular podem ser afetados apenas pelo estresse da injeção, um grupo amostrado 1 hora antes do desligamento da luz (controle claro) e um grupo amostrado 1 hora após o desligamento da luz (controle escuro) foi adicionado para testarmos o efeito da injeção. Acreditamos que a injeção não afetará os níveis de melatonina ocular, sendo seus níveis no grupo controle escuro equivalentes ao grupo amostrado 1 hora após o desligamento da luz injetado com salina.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Local de coleta, espécie estudada e manutenção em cativeiro

*Hypsiboas faber* (*sensu* Faivovich *et al.*, 2005), popularmente conhecida como “Sapo Ferreiro” ou “Sapo Martelo” é um hilídeo de grande porte, com ampla distribuição geográfica, sendo encontrado próximo a rios e lagos permanentes na Floresta Atlântica desde a Argentina até o nordeste do Brasil . (Martins & Haddad, 1988) (Fig. 1) . Apresenta reprodução sazonal, com início no mês de outubro e término no mês de março (Assis *et al.*, 2012). Os machos constroem um ninho para deposição dos ovos, com areia e argila (Martins, 1993), ou afastando a vegetação adjacente às margens de lagoas e riachos (Assis, 2010). Os machos são extremamente territorialistas e defendem seus ninhos e a área ao redor deles (Martins *et al.*, 1998). Os machos vocalizam em coro, emitindo sua vocalização de anúncio a partir do solo (no interior do ninho ou na sua proximidade) e, ocasionalmente, na vegetação em torno das lagoas. A vocalização de anúncio é a mais frequente, mas vocalizações agonísticas escalares são emitidas no contexto de invasão territorial (Martins & Haddad, 1988). Foram coletados 31 machos adultos no mês de outubro de 2012, no Jardim Botânico de São Paulo (23°38'08"S, 46°36'48"W) – São Paulo/Brasil. Estes indivíduos foram transportados para o laboratório e mantidos individualmente em caixas plásticas (20L - 43,0 (C) x 28,5 (L) x 26,5 (A) cm) com acesso a água livre. As tampas das caixas tinham furos para permitir a circulação do ar. Os animais permaneceram por dois meses em câmara climática do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (23° 33' 45" S, 46° 43' 40" W), com temperatura (21°C±2°C) e luminosidade controladas (13C:11E). Cada caixa continha um tubo de PVC cortado (10 x 12 cm) que tinha a função de abrigo para os animais. Foram oferecidos, uma vez por semana, grilos (*Gryllus sp*) e baratas (*Pcynoscelus sp*) como dieta. As caixas e potes de água eram

verificados diariamente, e as caixas limpas uma vez por semana ou quando houvesse necessidade. Além desses animais, foram coletados mais 9 machos no mês de novembro de 2013 na Estação Ecológica de Jataí, situada no município de Santo Antônio, São Paulo (22°06'57"S, 46°40'48"W), e mais 6 machos no mês de janeiro de 2014 no Jardim Botânico de São Paulo. Esses animais permaneceram durante duas semanas sob as mesmas condições e cuidados dos animais coletados anteriormente.

## 2.2. *Tratamento exógeno com ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico)*

Após dois meses mantidos em cativeiro, os animais foram divididos em dois grupos. Os indivíduos do grupo experimental (N = 15) foram injetados com uma solução contendo ACTH (Sigma-Aldrich, A6303 - 0,446  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , como em Narayan, 2011), sendo o volume injetado em média 105 $\mu\text{l}$ . Os indivíduos do grupo controle (N = 15) foram injetados com solução salina (0,9% NaCl), com volume equivalente ao usado no grupo experimental. As injeções foram administradas por via intraperitoneal (25 gauge) às 19:30h (logo após o desligamento da luz da câmara climática) com auxílio de luz vermelha. As injeções foram administradas dentro de 1 minuto após a remoção dos animais das caixas, e os mesmos retornaram as caixas imediatamente após a injeção. Amostras de sangue de cinco indivíduos de cada grupo foram coletadas com auxílio de luz vermelha de acordo com o protocolo descrito no item 2.2, em três horários distintos: às 20:30h (1 hora após a injeção, Grupo I), às 23:30h (3 horas após a injeção, Grupo II) e à 1:30h (6 horas após a injeção, Grupo III). Após a coleta, amostras de sangue foram processadas para confecção das lâminas para o perfil leucocitário, análise do hematócrito e amostras de plasma processadas para posterior realização dos testes de capacidade antimicrobiana plasmática e dosagem de corticosterona e testosterona.

### *2.3. Experimento controle para Melatonina Ocular*

Os animais coletados na Estação Ecológica de Jataí em novembro de 2013 e no Jardim Botânico de São Paulo em janeiro de 2014 foram utilizados para a realização de um experimento controle da melatonina ocular, em que os animais não receberam nenhum tipo de tratamento nem injeções. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, um grupo sendo denominado “controle claro”, no qual os olhos foram coletados uma hora antes do desligamento da luz (18:30h) e o outro grupo sendo denominado “controle escuro”, no qual os olhos foram coletados uma hora após o desligamento da luz da câmara climática (20:30h). Os olhos foram posteriormente processados para dosagem de melatonina de acordo com os procedimentos descritos no item 2.4.

### *2.4. Amostras de sangue e coleta dos olhos*

Os indivíduos foram capturados manualmente e uma amostra de sangue foi coletada em campo (cerca de 200  $\mu$ L), através de punção cardíaca com seringas de 1 mL e agulhas 26Gx1/2” previamente heparinizadas. Somente foram consideradas as amostras de sangue cuja coleta foi realizada dentro de 3 minutos após a captura do animal. Tal restrição deve-se ao fato de que após 3 minutos da captura, os níveis de corticosterona podem ser influenciados pelo estresse da captura e manipulação (Romero & Reed, 2005). Todas as amostras de sangue foram identificadas e mantidas em gelo até serem, na mesma noite, processadas. As amostras foram transferidas para microtubos, a partir dos quais foi separada uma alíquota para a montagem da lâmina de esfregaço sanguíneo e para a realização da contagem total de leucócitos (CTL) e análise do hematócrito, sendo o restante do sangue centrifugado (4 minutos a 3000 rpm) para a separação do plasma. As amostras de plasma foram divididas em microtubos, sendo

mantidas em um freezer -80°C. Estas amostras foram utilizadas posteriormente para a realização de testes de capacidade bactericida plasmática (CBP), dosagem de corticosterona (CORT) e testosterona (T). Ao final do experimento os animais foram medidos em seu comprimento rostro-cloacal (0,01mm) e massa corpórea (0,0001g), foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (75mg/kg) de solução de tiopental sódico (25mg/mL) (Thiopentax®) e espinalhados. Os indivíduos foram então dissecados e a massa dos testículos, baço, rim + inter-renais e fígado foi medida (0,0001g).

A coleta dos olhos foi realizada segundo Wright *et al* (1999). Os olhos foram dissecados e congelados em freezer -20°C para ensaio de melatonina ocular. Antes do ensaio, os olhos foram parcialmente descongelados e homogeneizados em 700µl de PBS. Após a homogeneização, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante resultante congelado em freezer -20°C para posterior dosagem de melatonina.

## 2.5. Capacidade Bactericida Plasmática (CBP)

A CBP de *H. faber* contra *Escherichia coli in vitro* foi avaliada de acordo com (Assis *et al.*, 2013). Brevemente, pellets de *E. coli* não patogênica (Microbiologics, #24311 - ATCC 8739) foram ressuspensos em 1 mL de Solução tampão fosfatada (PBS) estéril. A seguir, 100 µL desta solução foram adicionados a 5 mL de caldo tripticaseína de soja esterilizado (caldo TSB), e essa mistura foi mantida *overnight* à temperatura constante de 37°C. No dia seguinte, a concentração das bactérias foi estimada através da leitura da densidade óptica em aparelho de espectrofotometria de placa (comprimento de onda 600nm, placa de 96 poços - ELISA) e diluições em série, em uma solução estéril de Ringer para anfíbios [para 1 litro desta solução temos: 6,5g



de NaCl; 2g de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>; 100µL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(10%); 400µL de KCL(25%); 450µL de CaCl<sub>2</sub>(25%) e 0,2g de NaHCO<sub>3</sub>] foram realizadas para obtenção da concentração de trabalho (1x10<sup>6</sup> micro-organismos.mL<sup>-1</sup>). As amostras de plasma foram diluídas em solução estéril de Ringer (10 µL de plasma em 190 µL de Ringer), sendo então adicionados 10 µL da diluição de *E. coli* (1x10<sup>6</sup> micro-organismos mL<sup>-1</sup>). A mistura foi agitada e incubada a 37°C por 1 hora. O controle positivo do ensaio foi determinado pela adição de 10 µL da solução de trabalho de *E. coli* a 200µL de Ringer estéril, e o controle negativo foi determinado com 210 µL de Ringer estéril, sendo ambos incubados nas mesmas condições das amostras com plasma. Após a incubação, 500 µL de caldo TSB foram adicionados a cada amostra. A seguir, as amostras foram agitadas e transferidas em duplicata (300 µL por poço) para a placa de cultura de 96 poços, a qual foi incubada a 37°C. Após 2 horas de incubação, teve início uma sequência de quatro leituras da densidade óptica das amostras em espectrofotômetro com intervalos de 1 hora. A atividade antimicrobiana do plasma foi calculada como:  $1 - (\text{densidade óptica da amostra} / \text{densidade óptica do controle positivo})$ , representando a proporção de micro-organismos mortos nas amostras em relação ao controle positivo. Para a realização dos cálculos, utilizamos os dados de densidade óptica no momento inicial da fase de crescimento exponencial da *E. coli* no controle positivo, uma vez que neste momento evidenciamos o crescimento máximo da bactéria e, conseqüentemente, o maior índice de capacidade bactericida plasmática das amostras.

## 2.6. Análise dos parâmetros sanguíneos

### 2.6.(a). Contagem total de leucócitos (CTL)

Na mesma noite da coleta de sangue, 5 µL de sangue foram diluídos em 120 µL de solução de azul de toluidina (0,01%). Dez microlitros desta diluição foram colocados

em um hemocítômetro, e a contagem total de leucócitos foi realizada em microscópio óptico (objetiva de 40X, Nikon E200 - 104c). O número de leucócitos foi contado em um dos quadrantes e multiplicado pelo fator de diluição (25X).

#### 2.6.(b) Perfil leucocitário

Uma gota de sangue foi pipetada em uma lâmina para microscopia, sendo o esfregaço realizado com uma segunda lâmina. O esfregaço secou por 30 minutos, sendo em seguida fixado com álcool metílico durante 2 minutos. As lâminas foram montadas em duplicata para cada indivíduo. Posteriormente uma delas foi corada com solução de Giemsa (10%) por 15 minutos e observada através de microscopia óptica a um aumento de 1000X (Nikon E200, 104c) com auxílio de óleo de imersão próprio do fabricante. Cem leucócitos foram contados e identificados com base na morfologia celular de anfíbios segundo Terry (2006).

A partir do perfil leucocitário, quatro variáveis foram incorporadas nas análises: a contagem de eosinófilos, monócitos, basófilos e a relação entre neutrófilos e linfócitos circulantes (N/L). A contagem de monócitos foi inserida nas análises, pois estas células estão associadas à defesa contra infecções e bactérias (Campbell 1995; Davis, Cook & Altizer 2004; Davis *et al.*, 2008). Embora a função dos basófilos ainda não seja bem compreendida (Rupley 1997), esta variável foi inserida pois parece estar envolvida nos processos inflamatórios (Campbell 1995; Davis *et al.*, 2008 ). As demais variáveis foram selecionadas dado que a relação N/L encontra-se positivamente associada à CORT e a contagem de eosinófilos encontra-se negativamente associada à CORT em situações de estresse (Davis *et al.*, 2008). Adicionalmente, a contagem de eosinófilos encontra-se associada ao combate de verminoses (Abbas & Lichtman, 2003).

### 2.6.(c). Hematócrito

O HEM foi calculado como a proporção de células sanguíneas em relação ao volume total de sangue, após a centrifugação do sangue contido no tubo de microhematócrito (4 min a 3000rpm).

### 2.7. Dosagem hormonal

Para a dosagem de corticosterona e testosterona, inicialmente as amostras foram extraídas com éter segundo Mendonça *et al* (1996). Resumidamente, foram adicionados 3 mL de éter etílico às amostras de plasma, sendo esta mistura agitada por 30 segundos e centrifugada a 4°C por 9 minutos a 1800 rpm. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo as amostras foram mantidos a -80°C por 7 min. A fase líquida foi então transferida para novos tubos de ensaio, os quais foram mantidos em capela de exaustão de gases para evaporação do éter, por aproximadamente 24 horas.

CORT e T foram dosados através de kits de ELISA (Cayman Chemicals, cat no. 500655 e cat no. 582701, respectivamente). Antes da realização do ensaio, as amostras foram ressuspensas em tampão de ensaio. Brevemente, foram pipetados 50 µL de calibradores e amostras (em duplicata) em cada poço da respectiva placa de 96 poços. A seguir, foram adicionados 50 µL de traçador e 50 µL de antissoro específicos para o hormônio, sendo a placa então incubada à temperatura ambiente em um agitador orbital por 2h. As placas foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem e logo após foram pipetados 200 µL de reagente Ellman, seguindo-se de incubação em um agitador orbital por 50 min. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices-Spectra Max 250) com comprimento de onda 412nm. A média do coeficiente de variação intra e inter-ensaios foi 5,1 e 12,9%, respectivamente.

A melatonina foi dosada através de kits de ELISA (IBL- RE54021). Anteriormente ao ensaio, a extração das amostras de melatonina ocular foi realizada através de coluna de extração de sílica (Waters Sep- Pak® Vac). Inicialmente, a coluna foi preparada adicionando 1mL de metanol 100% centrifugando em 120 x g por um minuto, seguido de 1mL de água ultrapura centrifugando novamente por mais um minuto. Após a preparação da coluna, 0,5mL do padrão, controle e amostras de melatonina ocular, juntamente com 0,5mL de água ultrapura foram adicionados na coluna e centrifugados por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1mL de metanol 10% com centrifugação de 5 minutos 2 vezes, seguido pela adição de 1mL de metanol 100% por centrifugação durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram secas pela evaporação do metanol através de centrífuga de evaporação. O extrato das amostras foi mantido em freezer -20°C até sua reconstituição em água ultrapura no dia da realização do ensaio. Para a montagem da placa de ELISA do kit foram pipitados 50µL de cada padrão, controle e amostra de melatonina ocular extraídos em seus respectivos poços na placa. Posteriormente foram adicionados mais 50µL de melatonina biotina e 50µL do antissoro de melatonina, seguido pela incubação de aproximadamente 18 horas em temperatura de 2- 8°C. Após a incubação a solução foi descartada e a placa foi lavada com 250µL de solução de lavagem por 3 vezes, sendo logo após pipetados 200 µL de solução de substrato PNPP, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por mais 40 minutos em agitador orbital. Para parar a reação do substrato, foi adicionado 50 µL de solução 'stop' PNPP, seguido de incubação por 60 minutos. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (comprimento de onda 405nm).

## 2.8. Análise estatística

Os dados de campo e pós- experimento foram inicialmente submetidos à estatística descritiva e ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Algumas variáveis apresentaram ausência de normalidade e foram transformadas para que se ajustassem aos pré-requisitos dos testes paramétricos: dados basais – 1) Raiz: Eosinófilo e Monócito; 2)  $\text{Log}_{10}$ : Linfócito; N:L; Corticosterona e Testosterona. Dados pós-experimento – 1)  $\text{Log}_{10}$ : Neutrófilo; Basófilo; Monócito -  $\text{log}_{10}$  ; N:L ; Gônada; Corticosterona e Testosterona. Para verificar a existência de efeito do tratamento com ACTH sobre as diversas variáveis, utilizamos teste T para amostras independentes. As hipóteses direcionais foram testadas com testes de uma cauda. Correlações (Pearson) foram também utilizadas para investigar possíveis relações entre as diversas variáveis em campo e após o período de manutenção em cativeiro, para essa análise foi feita massa relativa dos órgãos. Todas as análises foram feitas no programa SPSS versão 17.

### 3. RESULTADOS

A estatística descritiva dos dados para os animais em condições de campo, ao final do experimento de injeção intraperitoneal de ACTH e experimento controle claro e escuro encontra-se nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. O perfil leucocitário e exemplos dos tipos leucocitários dos indivíduos em campo encontram-se na Figura 1 e 2, respectivamente.

O tratamento com ACTH aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona em 6,65 vezes após 1 h ( $t = -8,138$ ,  $df = 7$ ,  $P = 0,000$ ; Fig. 3). Os níveis plasmáticos de testosterona e os níveis de melatonina ocular também foram alterados 1 h após a injeção de ACTH, porém houve uma diminuição de 7,09 vezes nos níveis plasmáticos de testosterona ( $t = 2,316$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0,050$ ; Fig. 4) e 2,4 vezes nos níveis de melatonina ocular ( $t = 2,689$ ,  $df = 5$ ,  $P = 0,041$ ; Fig. 5). Após 6 h da injeção de ACTH, o hematócrito foi aumentado em 1,52 vezes ( $t = -2,488$ ,  $df = 9$ ,  $P = 0,035$ ; Fig. 6) e os níveis de melatonina ocular também foram aumentados em 1,54 vezes ( $t = -2,909$ ,  $df = 5$ ,  $P = 0,033$ ; Fig. 5). O tratamento com ACTH não afetou os aspectos imunitários estudados dentro do intervalo amostrado ( $P \geq 0,183$ ).

Quando considerados os grupos controle claro e escuro, houve um aumento nos níveis de melatonina ocular de duas vezes uma hora após o desligamento da luz ( $t = -2,541$ ,  $df = 10$ ,  $P = 0,029$ ; Fig. 5). Os níveis de melatonina ocular do grupo controle escuro não diferiram dos medidos no grupo injetado com salina no mesmo horário ( $t = 0,274$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0,802$ ).

Dentre as variáveis de campo, foi observada uma correlação positiva dos dados individuais entre capacidade antimicrobiana plasmática e contagem total de leucócito ( $r = 0,465$ ,  $P = 0,011$ ; Fig. 7).

#### 4. DISCUSSÃO

A injeção de ACTH aplicada em *Hypsiboas faber* promoveu um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona uma hora após o tratamento, bem como uma diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona e alterações dos níveis oculares de melatonina. Desta forma, as alterações fisiológicas decorrentes do tratamento com ACTH foram condizentes com uma resposta de estresse observada em diversos grupos de vertebrados (Hunt *et al.*, 2004; Cockrem 2007, Narayan *et al.*, 2010), embora aspectos imunitários não tenham sido afetados pelo tratamento no intervalo temporal amostrado.

O perfil leucocitário basal varia consideravelmente entre grupos de vertebrados. Em mamíferos, o tipo leucocitário mais abundante é o neutrófilo, enquanto que nas aves são os linfócitos (Davis *et al.*, 2008). Embora o leucócito mais encontrado em *H. faber* tenha sido o neutrófilo, em *H. albopunctatus* (Monteiro, 2013) e em algumas espécies do gênero *Rhinella* (*R. ornata*, *R. icterica* e *R. jimi*), o linfócito foi mais comumente encontrado (Assis *et al.*, dados submetidos para publicação). No Bufonídeo *Anaxyrus americanus*, o número de neutrófilos foi maior que o de linfócitos (Davis *et al.*, 2008). É possível que esta variação interespecífica possa ser, em parte, associada à amostragem em diferentes fases do ciclo reprodutivo. Como *H. faber* apresenta um pico de corticosterona plasmática em outubro, época de início da temporada reprodutiva (Assis *et al.*, 2012), e glicocorticóides elevados promovem linfopenia (diminuição do número de linfócitos) e neutrofilia (aumento do número de neutrófilos) (Davis *et al.*, 2008), é possível que este perfil leucocitário pouco usual seja resultante destes níveis hormonais elevados. Amostragens realizadas em diferentes fases da temporada reprodutiva são necessárias para testar esta hipótese.

O aumento de CORT em resposta à injeção de ACTH foi esperado, uma vez que este é o principal glicocorticoide encontrado em anfíbios, e tem sua secreção estimulada por ACTH (Norris, 2007). Adicionalmente a maioria das espécies de anfíbios e répteis responde a estressores através do aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona (Guillette *et al.*, 1995; Lance, 1990; Tyrrell & Cree, 1998; Moore & Jessop, 2003). Um pico de corticosterona plasmática foi detectado em *H. faber* após 1 hora à injeção de ACTH, havendo uma redução destes níveis para os valores originais após 3 horas do tratamento. Embora um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona tenha sido resultante do tratamento com ACTH em diversos tetrápodes ectotermos (Gist & Kaplan, 1975; Lance & Lauren, 1983; Romero & Wikelsky, 2006; Preest, 2005; Callard, 1975; Narayan *et al.*, 2011), bem como anfíbios submetidos ao estresse de cativeiro e manuseio (Coddington & Cree, 1995; Homan *et al.*, 2003; Ricciardella *et al.*, 2010; Woodley & Lacy, 2010), uma grande variedade temporal da resposta têm sido detectada. Narayan e colaboradores (2011), por exemplo, mediram as concentrações de metabólitos de corticosterona na urina do sapo-cururu (*Rhinella marina*) após injeção de ACTH, estresse de captura e cativeiro, e observaram diferentes padrões de resposta associados aos diferentes estressores. Essa diferença na resposta temporal se deve à modulação adrenocortical, um mecanismo pelo qual os vertebrados podem modular mudanças na taxa, duração e magnitude da síntese e liberação de glicocorticoides em resposta a estressores (Wingfield & Romero, 2001; Moore & Jessop, 2003). A modulação adrenocortical tem sido interpretada como um mecanismo relevante para o fitness, dado que permite aos indivíduos modificar sua sensibilidade adrenocortical a estressores ambientais, bem como tentar diminuir a resposta do eixo HHA ao estresse durante a reprodução, desse modo aumentando o sucesso reprodutivo (Wingfield *et al.*, 1998, Moore & Jessop, 2003).



Concomitante à elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona, nossos resultados revelaram uma diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona uma hora após a administração do ACTH. Corroborando com nossos resultados e em paralelo com os padrões observados também para outros vertebrados, alguns estudos têm demonstrado que níveis plasmáticos particularmente altos de CORT, sendo esta elevação natural ou experimentalmente induzida, encontram-se negativamente correlacionadas com os níveis de andrógenos e a manifestação do comportamento vocal em anuros (Burmeister *et al.*, 2001; Leary *et al.*, 2006; Marler & Ryan, 1996; Orchinik *et al.*, 1988). Além disso, uma diminuição da concentração de testosterona ao mesmo tempo em que há um aumento das concentrações de corticosterona em resposta a captura e manuseio em curto prazo tem sido encontrada em várias espécies de anfíbios (Leboulenger *et al.* 1979; Paolucci *et al.* 1990; Gobbetti & Zerani 1996; Mosconi *et al.* 2006; Woodley & Lacy 2010; Narayan *et al.*, 2012). Em estudos realizados com *Physalaemus pustulosus* (Marler & Ryan, 1996), *Hyla cinerea* (Burmeister *et al.*, 2001) e *Taricha granulosa* (Moore & Miller, 1984; Orchinik *et al.*, 1991) a administração de CORT e/ou confinamento resulta em depressão dos níveis de andrógenos, bem como na redução do comportamento reprodutivo. O estresse de manuseio e cativo realizado em *Desmognathus ocoee* (Woodley & Lacy, 2010) e *Rana esculenta* (Mosconi *et al.*, 2006) resultaram em diminuição dos níveis de testosterona e elevação dos níveis de CORT, mostrando serem poderosos inibidores da secreção de andrógenos. Mais recentemente, Narayan e colaboradores (2013) mostraram que a espécie *Rhinella marina* apresenta elevação tanto dos níveis de corticosterona plasmática quanto dos metabólitos de corticosterona da urina com concomitante diminuição dos níveis de testosterona plasmática e urinária após uma hora de estresse de captura e manuseio.

Os glicocorticóides modulam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) em diversos pontos, interferindo no potencial reprodutivo (Sapolsky *et al.*, 2000). Os glicocorticoides diminuem os níveis de esteroides sexuais plasmáticos por interferirem na secreção hipotalâmica de GnRH e gonadotrofinas; promoverem redução da concentração de receptores de LH na gônadas e, conseqüentemente, da responsividade à esta gonadotrofina (Johnson *et al.*, 1982, Sapolsky, 1985, Hayashi & Moberg, 1990, Sapolsky *et al.*, 2000); podem atuar diretamente no tecido gonadal inibindo a síntese de esteroides (Norris & Lopez, 2011); ou podem alterar o metabolismo e transporte de hormônios esteroides sexuais (Norris & Lopez, 2011). Outro mecanismo que explica a correlação negativa entre a atividade dos eixos HHI e HHG envolve as globulinas de ligação. A corticosterona está presente no sangue como hormônio livre e também ligado às proteínas de ligação de corticosterona (CBG). No entanto, a testosterona também se liga às CBG (Cockrem & Silverin, 2002, Narayan *et al.*, 2012), e altos níveis de corticosterona livre no sangue durante uma resposta de estresse podem competir com a testosterona pelos sítios de ligação na CBG, levando a um aumento da concentração de testosterona livre. Isto poderia potencialmente aumentar o feedback negativo da testosterona no eixo HHG e desse modo reduzir a secreção de testosterona durante a resposta de estresse (Narayan *et al.*, 2011).

Um típico aumento noturno da concentração ocular de melatonina foi observado em *Hypsiboas faber*, resultado este consistente com estudos realizados em muitos animais (Jessop *et al.*, 2002). Entretanto, esse padrão noturno de aumento dos níveis de melatonina ocular foi afetado dualmente pelo tratamento de injeção de ACTH. Estudos recentes sugerem que a corticosterona pode ter uma ação direta sobre a glândula pineal, modulando a produção de melatonina (Lopes *et al.*, 2001; Fernandes, 2009). O trabalho realizado por Fernandes (2009) utilizando diferentes concentrações de corticosterona

confirma que este hormônio apresenta um efeito dual sobre a pineal, podendo potencializar ou inibir a produção de melatonina. Além deste trabalho, Wright e colaboradores (1999) demonstraram que girinos de *Rana catesbeiana* recebendo injeção de hidrocortisona mostraram uma tendência a um efeito dual da resposta da melatonina ocular à injeção, sendo que 6 horas após a injeção houve uma diminuição da melatonina ocular, e 15 horas após a injeção foi observado um aumento da mesma.

Após uma hora do desligamento da luz e da aplicação da injeção de ACTH, observamos uma redução dos níveis oculares de melatonina de machos de *H. faber* quando comparados aos animais que receberam injeção de salina no mesmo horário. De forma semelhante, a submissão de tartarugas, aves e humanos à atividade física no período noturno, resulta em redução dos níveis plasmáticos de melatonina, sugerindo que o aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides acarreta em redução aguda da atividade pineal (Montelone *et al.*, 1990; Van-Reeth *et al.*, 1994; Gwinner, 1996; Buxton *et al.*, 1997; Jessop *et al.*, 2002). Entretanto, após 6 horas do desligamento da luz e aplicação das injeções, o grupo de *H. faber* que recebeu injeção de ACTH exibiu um aumento nos níveis de melatonina ocular quando comparado ao grupo que recebeu injeção de salina. Juntamente com esse aumento da melatonina ocular, houve uma diminuição da corticosterona plasmática para níveis próximos ao normal. Em um estudo realizado com roedores, Couto-Moraes e colaboradores (2009) submeteram os animais a um estresse de restrição, que é considerada uma condição injuriante leve (Fernandes 2009), e observaram após 2 horas uma correlação positiva entre a corticosterona circulante e produção de melatonina (Couto-Moraes *et al.*, 2009). Um experimento utilizando o método de perfusão por microdiálise intrapineal em roedores revelou que a corticosterona potenciou a síntese de melatonina (Fernandes, 2009).

O efeito dual que a corticosterona causa na produção da melatonina é devido à ativação do eixo HPA, responsável pela liberação dos peptídeos CRH e ACTH, esses por sua vez são capazes de aumentar a liberação de noradrenalina (Sabban *et al.*, 2004, Serova *et al.*, 2003, Fernandes, 2009) induzindo a estimulação concomitante de adrenoceptores  $\alpha$  e  $\beta$ , que leva a uma redução da produção de melatonina. Por outro lado, a corticosterona em baixas concentrações potencia a produção do precursor N-acetilserotonina e da própria melatonina induzida por concentrações moderadas de noradrenalina que ativam apenas adrenoceptores  $\beta$  (Fernandes, 2009).

O tratamento de *H. faber* com ACTH resultou em aumento do hematócrito após 6 horas. Sabe-se que a eritropoiese é estimulada frente ao tratamento prolongado com glicocorticoides em ratos e rãs (Fisher 1958, Meints & Carver, 1973). Entretanto a produção de eritrócitos não deve ter sido significativamente elevada em *H. faber* como resposta ao tratamento com ACTH dentro do curto período amostrado. Sabe-se também que o ACTH estimula a secreção de aldosterona, e que níveis elevados de cortisol ou corticosterona podem se ligar efetivamente aos receptores de mineralocorticoides (Norris, 2007). Desta forma, é possível que exista alguma relação entre a alteração de hematócrito observada e alterações de balanço hídrico decorrentes do tratamento com ACTH.

Alterações de ordem imunitária não foram observadas em resposta ao tratamento com ACTH em *H. faber*. A resposta leucocitária ao estresse pode demorar de horas a dias em vertebrados dependendo do grupo filogenético (Davis *et al.*, 2008), incluindo anfíbios (Bennett & Harbottle, 1968; Bennett *et al.*, 1972). A submissão ao estresse envolvendo restrição de movimentos resultou em uma queda de 10% da capacidade bactericida plasmática (CBP) após 12 horas em sapos *Rhinella marina* (Graham *et al.*, 2012) e após 24 horas em *R. icterica* (Assis *et al.*, dados não publicados). A manutenção

em cativeiro por três meses também diminuiu a CBP de sapos *Rhinella icterica* em 41,18% (Assis *et al.*, dados não publicados). Desta forma, é provável que o tempo de amostragem de sangue pós-tratamento com ACTH também tenha sido insuficiente para observar alterações de ordem imunitária em *H. faber*.

Um dado adicionalmente interessante foi a correlação positiva dos dados individuais entre capacidade antimicrobiana plasmática e contagem total de leucócitos medidos em campo. Sabe-se que o estresse agudo resulta em uma rápida diminuição do número total de leucócitos do sangue (Dhabhar *et al.*, 1996), e uma diminuição da capacidade antimicrobiana plasmática tem sido encontrada em anfíbios anuros (Graham *et al.*, 2012, Assis *et al.*, dados não publicados) e aves (Buehler *et al.*, 2008) após o estresse de restrição e cativeiro. Sabendo que a resposta ao estresse pode afetar características de ordem imunitária, essas variáveis poderiam ser usadas como um índice de estresse de populações naturais (Janin *et al.*, 2011; Janin *et al.*, 2012). Além disso, estudo dos efeitos do estresse sobre os aspectos da reprodução e imunidade tem importância sob o ponto de vista da biologia da conservação, pois fornece ferramentas para detectar fragilidade e elucidar aspectos relacionados ao declínio populacional frente a estressores ambientais e/ou antropogênicos (Wikelski & Cooke, 2006).

Nossos resultados evidenciam que a ativação de eixo HHI em *Hypsiboas faber* resulta em redução dos níveis plasmáticos de T e alteração dos níveis oculares de MEL. Em longo prazo, estressores poderiam desta forma, agir como inibidores da atividade reprodutiva além de modular a atividade pineal e, conseqüentemente, imunitária. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer melhor qual a concentração de glicocorticoides que pode afetar a reprodução, imunocompetência e síntese de melatonina em anuros, bem como sua resposta temporal a estressores.

## 5. FIGURAS e TABELAS

Tabela 1: Estatística descritiva dos parâmetros sanguíneos, da massa, capacidade bactericida plasmática, níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona e níveis oculares de melatonina para os indivíduos de *Hypsiboas faber* em condições de campo.

	Parâmetro	N	Grupo	Mínimo	Máximo	Média± DP	
CAMPO	HEM (%)	22	Basal	18,18	40,00	31,05 ± 5,01	
	CTL (células/ µl)	29	Basal	50,00	1775,00	740,51 ± 434, 98	
	N:L	29	Basal	0,13	22,33	4,34 ± 5,20	
	CBP (%)	35	Basal	0,00	0,82	0,25 ± 0,30	
	CORT (ng/mL)	27	Basal	3,34	30,17	12,46 ± 7,60	
	TEST (ng/mL)	21	Basal	3,88	83,68	23,01 ± 17,85	
	Perfil leucocitário (%)	Neutrófilo	29	Basal	11,00	74,00	49,93 ± 15,54
		Eosinófilo	29	Basal	0,00	16,00	4,58 ± 4,67
		Basófilo	29	Basal	0,00	16,00	5,93 ± 4,13
		Linfócito	29	Basal	3,00	84,00	24,82 ± 18,03
		Monócito	29	Basal	1,00	35,00	14,72 ± 10,60
	Massa	32	Basal	25,05	62,93	46,58 ± 7,67	

**CBP:** Capacidade Bactericida Plasmática; **HEM:** Hematócrito; **N:L:** Razão Neutrófilo/Linfócito; **CTL:** Contagem Total de Leucócitos; **CORT:** níveis plasmáticos de corticosterona; **TEST:** níveis plasmáticos de testosterona.

**Tabela 2:** Estatística descritiva dos parâmetros sanguíneos, massa, capacidade bactericida plasmática, níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona e níveis oculares de melatonina para os indivíduos de *Hypsiboas faber* pós-experimento.

1 hora após injeção de Salina e ACTH	Parâmetro	N	Grupo	Mínimo	Máximo	Média± DP
	Perfil Leucocitário (%)	CTL (células/ µl)	5	Salina	0,11	0,27
4			ACTH	0,18	0,33	25,75 ± 0,06
N:L		5	Salina	225,00	1100,00	655 ± 345,68
		4	ACTH	475,00	1250,00	900 ± 363,43
CBP (%)		5	Salina	0,07	1,08	0,434 ± 0,40
		4	ACTH	0,14	0,56	0,32 ± 0,18
CORT (ng/mL)		5	Salina	0,00	0,84	0,168 ± 0,37
		5	ACTH	0,00	0,78	0,15 ± 0,34
TEST (ng/mL)		5	Salina	11,38	21,22	15,79 ± 4,25
		4	ACTH	74,22	177,25	105,13 ± 48,77
MEL (ng/mL)		2	Salina	2,24	10,69	6,46 ± 5,97
		3	ACTH	0,35	1,22	0,91 ± 0,48
		4	Salina	0,06	0,20	0,12 ± 0,06
		4	ACTH	0,03	0,1	0,05 ± 0,03
Perfil Leucocitário (%)	Neutrófilo	5	Salina	6,00	43,00	22,4 ± 14,32
		4	ACTH	11,00	31,00	20,75 ± 8,65
	Eosinófilo	5	Salina	0,00	3,00	1,4 ± 1,34
		4	ACTH	0,00	5,00	2,25 ± 2,21
	Basófilo	5	Salina	1,00	12,00	6,2 ± 5,40
		4	ACTH	2,00	4,00	2,75 ± 0,95
	Linfócito	5	Salina	40,00	82,00	63,6 ± 16,77
		4	ACTH	55,00	79,00	68,25 ± 12,09
Monócito	5	Salina	2,00	13,00	6,4 ± 4,82	
	4	ACTH	2,00	10,00	6 ± 4,08	
Massa	5	Salina	22,53	41,32	33,55 ± 7,31	
	5	ACTH	29,20	42,78	36,78 ± 5,21	

**CONTINUAÇÃO TABELA 2: 3 horas após injeção de salina e ACTH.**

	Parâmetro	N	Grupo	Mínimo	Máximo	Média± DP	
	3 horas após injeção de Salina e ACTH	HEM (%)	5	Salina	0,11	0,43	0,27 ± 0,12
		6	ACTH	0,18	0,36	0,24 ± 0,07	
CTL (células/ µl)		5	Salina	75,00	1100,00	650 ± 448,26	
		6	ACTH	625,00	1175,00	937,5 ± 184,22	
N:L		5	Salina	0,44	5,31	2,15 ± 1,92	
		6	ACTH	0,30	4,41	2,09 ± 1,90	
CBP (%)		5	Salina	0,00	0,68	0,17 ± 0,29	
		6	ACTH	0,00	0,58	0,22 ± 0,25	
CORT (ng/mL)		5	Salina	6,00	47,49	25,07 ± 16,11	
		6	ACTH	2,24	86,97	39,73 ± 32,17	
TEST (ng/mL)		5	Salina	0,33	14,35	7,32 ± 6,14	
		6	ACTH	0,44	4,72	1,59 ± 1,63	
MEL (ng/mL)		4	Salina	0,05	0,27	0,13 ± 0,09	
		5	ACTH	0,07	0,24	0,15 ± 0,07	
Perfil Leucocitário (%)		Neutrófilo	5	Salina	22,00	69,00	48,8 ± 18,18
			6	ACTH	19,00	75,00	45,83 ± 23,42
		Eosinófilo	5	Salina	0,00	8,00	4,2 ± 3,03
			6	ACTH	1,00	8,00	6,5 ± 2,73
		Basófilo	5	Salina	0,00	17,00	5,4 ± 6,87
			6	ACTH	2,00	15,00	5,66 ± 4,88
	Linfócito	5	Salina	13,00	50,00	32,4 ± 14,25	
		6	ACTH	16,00	63,00	36,5 ± 20,59	
	Monócito	5	Salina	1,00	21,00	9,2 ± 7,39	
		6	ACTH	3,00	12,00	5,5 ± 3,27	
	Massa	5	Salina	26,81	52,90	39,30 ± 10,10	
		6	ACTH	21,54	43,70	36,63 ± 8,03	



**CONTINUAÇÃO TABELA 2: 6 horas após injeção de salina e ACTH.**

	Parâmetro	N	Grupo	Mínimo	Máximo	Média± DP	
	6 horas após injeção de Salina e ACTH	HEM (%)	5	Salina	0,11	0,28	0,19 ± 0,07
		5	ACTH	0,25	0,33	0,29 ± 0,03	
CTL (células/ µl)		5	Salina	525,00	1125,00	675 ± 253,10	
		5	ACTH	125,00	900,00	675 ± 318,68	
N:L		5	Salina	0,11	0,76	0,46 ± 0,28	
		5	ACTH	0,14	1,25	0,59 ± 0,47	
CBP (%)		5	Salina	0,00	1,00	0,28 ± 0,44	
		5	ACTH	0,00	0,36	0,13 ± 0,18	
CORT (ng/mL)		5	Salina	1,81	38,34	24,48 ± 16,21	
		5	ACTH	3,26	26,37	17,54 ± 9,33	
TEST(ng/mL)		5	Salina	0,26	2,67	0,98 ± 0,97	
		5	ACTH	0,32	6,04	2,21 ± 2,30	
MEL (ng/mL)		4	Salina	0,07	0,13	0,11 ± 0,02	
		2	ACTH	0,15	0,2	0,17 ± 0,03	
Perfil Leucocitário (%)		Neutrófilo	5	Salina	9,00	38,00	24 ± 10,97
			5	ACTH	11,00	45,00	27 ± 15,16
		Eosinófilo	5	Salina	0,00	25,00	7 ± 10,27
			5	ACTH	0,00	4,00	1 ± 1,7
		Basófilo	5	Salina	3,00	7,00	4,4 ± 1,67
			5	ACTH	3,00	11,00	6,8 ± 3,03
	Linfócito	5	Salina	37,00	80,00	59,4 ± 17,14	
		5	ACTH	36,00	76,00	54,8 ± 16,11	
	Monócito	5	Salina	2,00	10,00	5,2 ± 3,27	
		5	ACTH	7,00	19,00	10,4 ± 5,07	
Massa	5	Salina	29,75	45,83	35,86 ± 6,60		
	5	ACTH	26,45	45,44	36,87 ± 7,71		

CBP: Capacidade Bactericida Plasmática; HEM: Hematócrito; N:L: Razão Neutrófilo/Linfócito; CTL: Contagem Total de Leucócitos; CORT: níveis plasmáticos de corticosterona; TEST: níveis plasmáticos de testosterona; MEL: níveis oculares de melatonina; ACTH : hormônio adrenocorticotrópico.

**Tabela 3:** Estatística descritiva dos níveis oculares de melatonina para os indivíduos de *Hypsiboas faber* nos controles claro e escuro.

Parâmetro	N	Grupo	Mínimo	Máximo	Média± DP
MEL (ng/mL)	6	Claro	0,020	0,090	0,05 ± 0,02
MEL (ng/mL)	6	Escuro	0,070	0,190	0,11 ± 0,05

MEL: níveis oculares de melatonina.

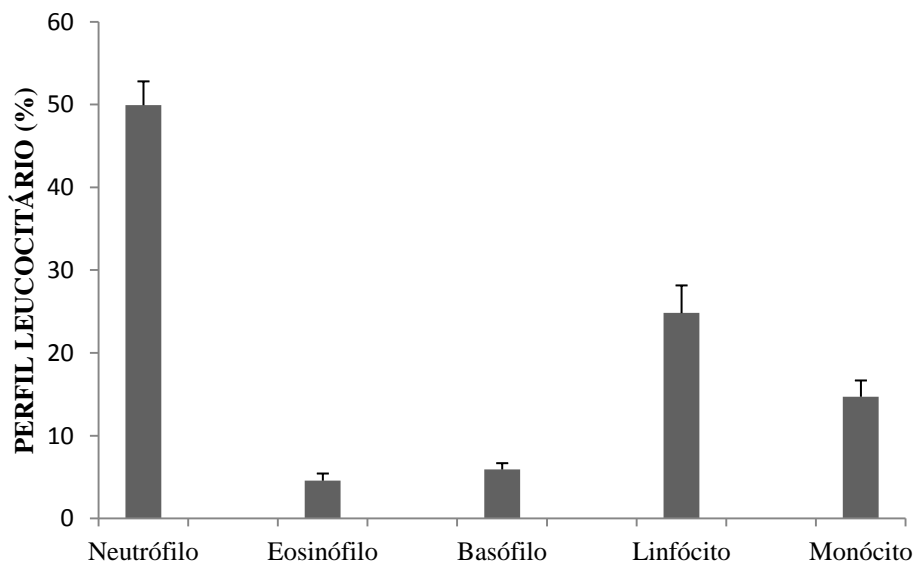


Figura 1: Perfil leucocitário dos machos adultos de *Hypsiboas faber* em campo. As barras representam Média ± Desvio padrão. O  $N$  é o mesmo para todas as variáveis ( $N = 29$ ).

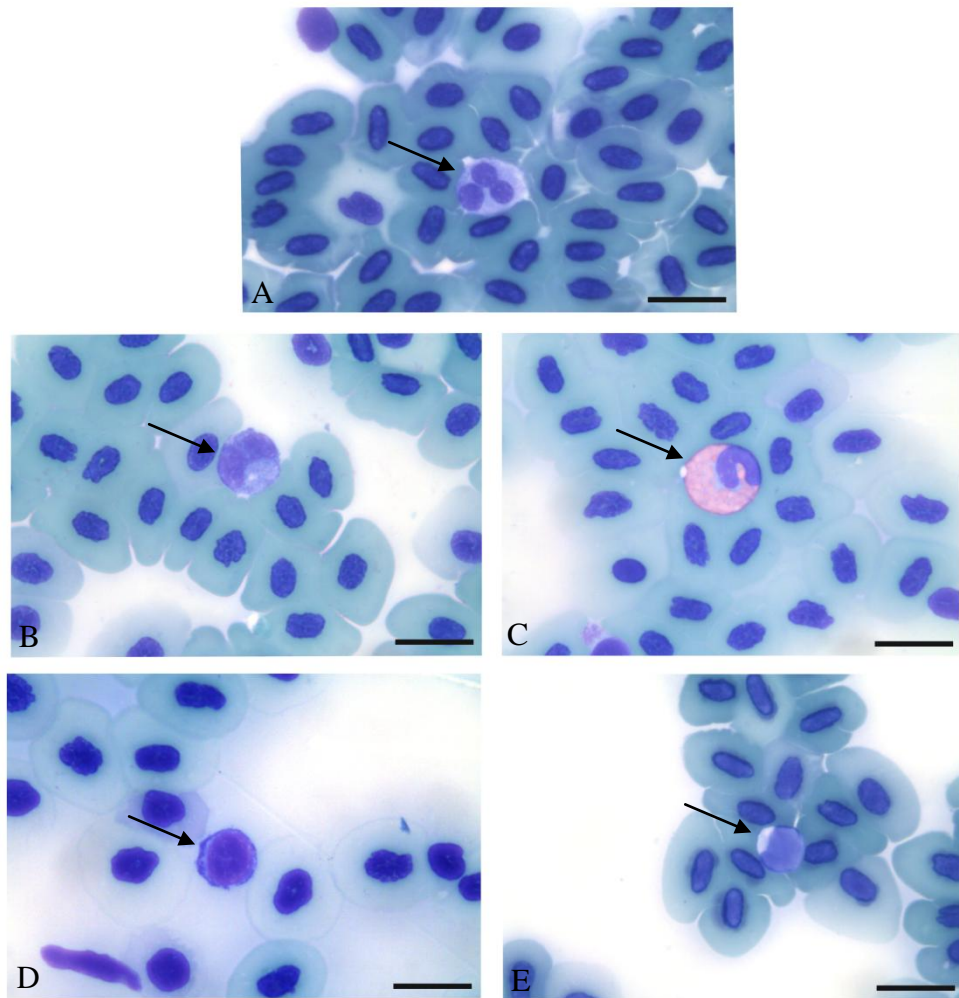


Figura 2: Tipos celulares sanguíneos de machos adultos de *Hypsiboas faber*. Os leucócitos estão evidenciados individualmente, com seta, em cada caixa: Neutrófilo (A), Monócito (B), Eosinófilo (C), Basófilo (D) e Linfócito (E). As células ao redor dos leucócitos são hemáceas nucleadas. Barra = 10 $\mu$ m.

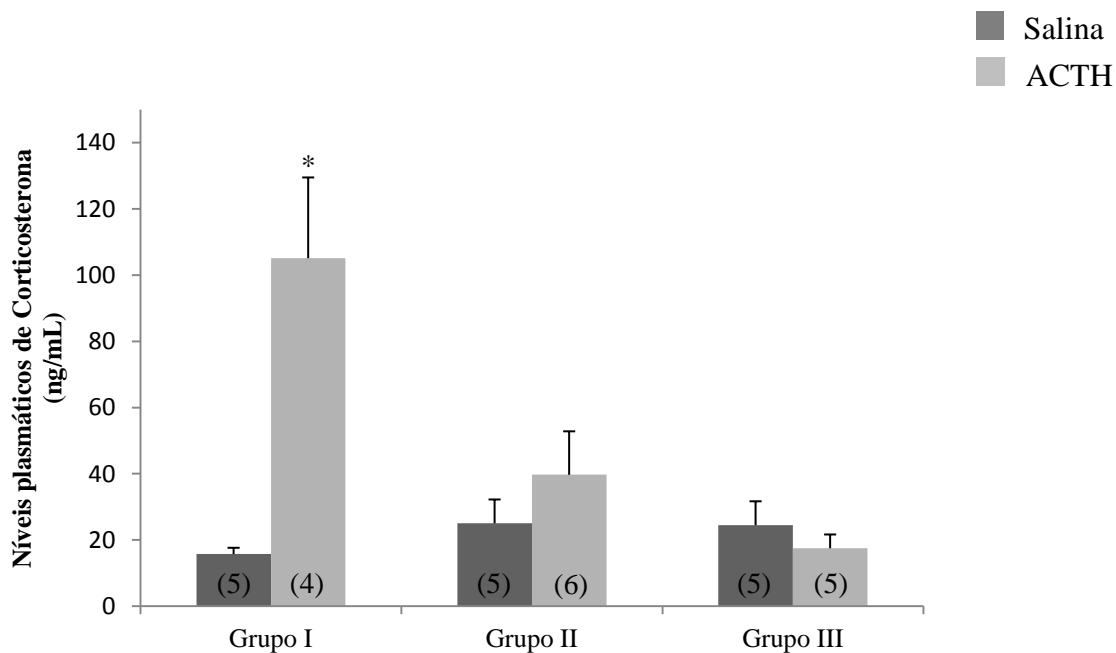


Figura 3: Níveis plasmáticos de corticosterona de machos adultos de *Hypsiboas faber* após injeção de salina e ACTH em três horários distintos (1 hora, 3 horas e 6 horas após o desligamento da luz). As barras representam Média  $\pm$  Desvio padrão com o *N* entre parênteses; \* representa diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

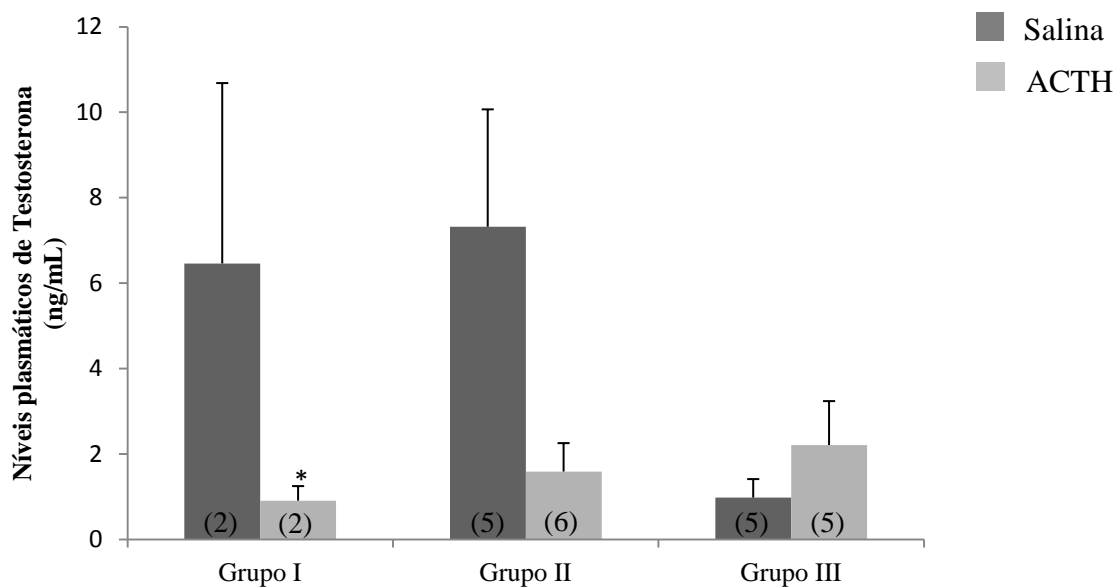


Figura 4: Níveis plasmáticos de testosterona de machos adultos de *Hypsiboas faber* após injeção de salina e ACTH em três horários distintos (1 hora, 3 horas e 6 horas após o desligamento da luz). As barras representam Média  $\pm$  Desvio padrão com o *N* entre parênteses; \* representa diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

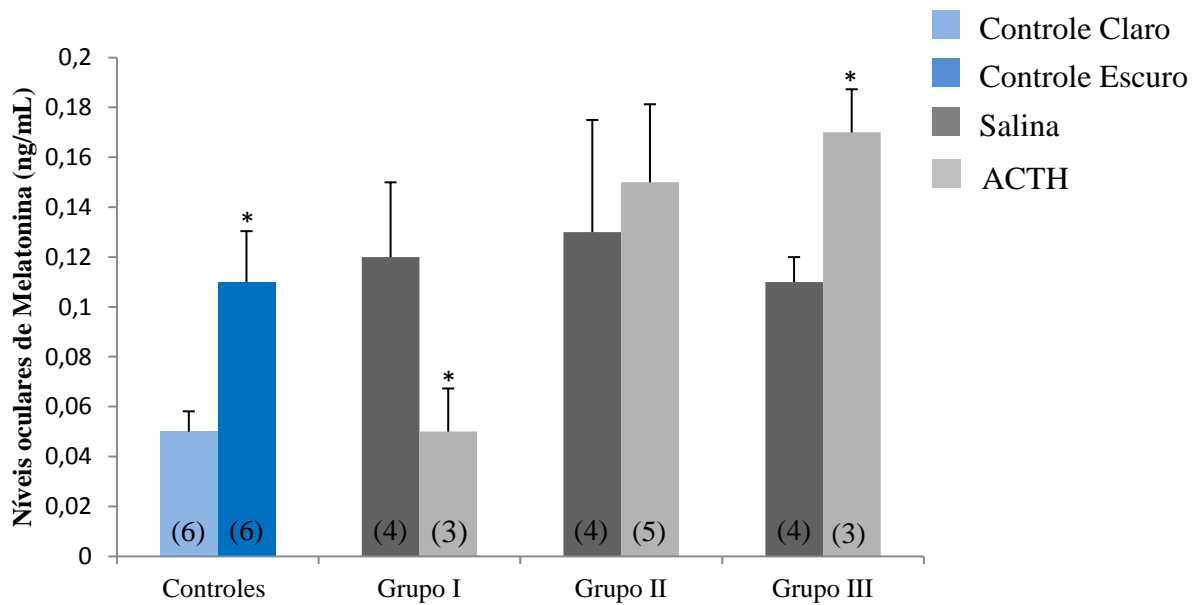


Figura 5: Níveis oculares de melatonina de machos adultos de *Hypsiboas faber* nos controles claro (1 hora antes do desligamento da luz) e escuro (1 hora após o desligamento da luz) e após injeção de salina e ACTH em três horários distintos (1 hora, 3 horas e 6 horas após o desligamento da luz). As barras representam Média  $\pm$  Desvio padrão com o *N* entre parênteses; \* representa diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

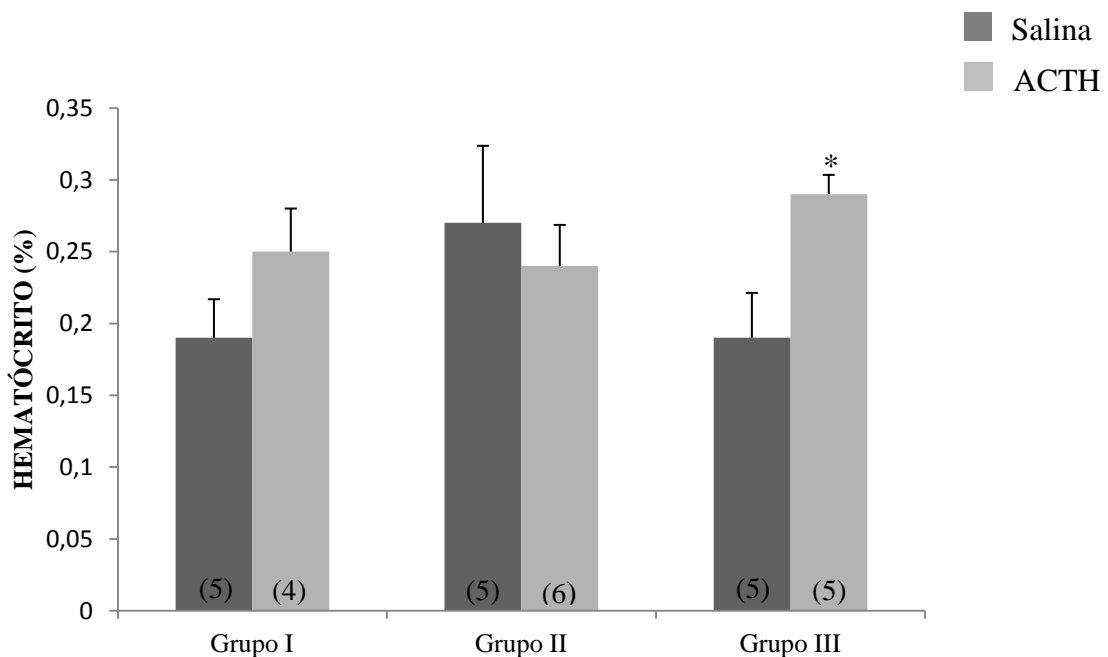


Figura 6: Hematócrito de machos adultos de *Hypsiboas faber* após injeção de salina e ACTH em três horários distintos (1 hora, 3 horas e 6 horas após o desligamento da luz). As barras representam Média  $\pm$  Desvio padrão com o *N* entre parênteses; \* representa diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ).

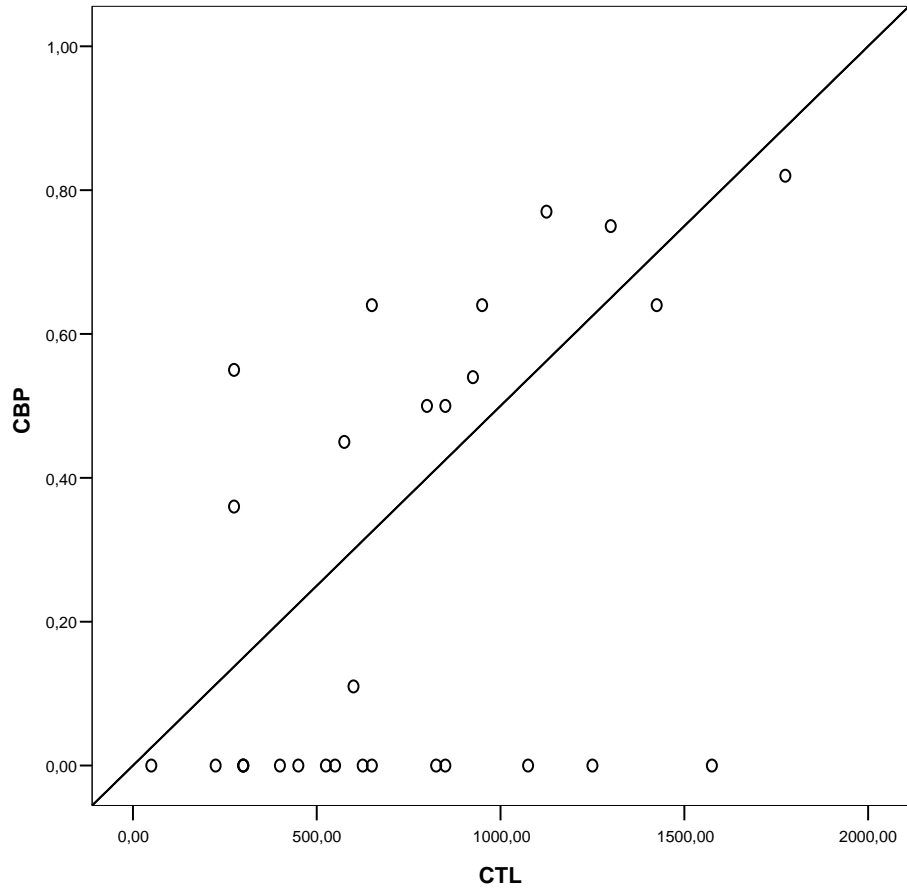


Figura 7 : Correlação positiva entre capacidade antimicrobiana plasmática (CBP) e contagem total de leucócitos (CTL) em machos adultos de *Hypsiboas faber*, coletados em campo, durante o período noturno.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. & Lichtman, A. H., 2003. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª Edição, Elsevier, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.
- Acevedo-Whitehouse, K. & Duffus, A.L.J., 2009. Effects of environmental change on wildlife health. **Philos T Roy Soc B**. 364, 3429–3438.
- Amario, A. & Castellanos, J. M., 1984. A comparison of corticoadrenal and gonadal responses to acute immobilization stress in rats and mice. **Physio Behav**. 32, 517–519.
- Assis, V.R. 2010. Relação entre os níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona no comportamento vocal e territorial no sapo martelo (*Hypsiboas faber*). Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- 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.
- Barriga, C., Martín, E.O., Rodriguez, A.B., 2002. Physiological Concentrations of Melatonin and Corticosterone in Stress and their Relationship with Phagocytic Activity. **J Endocrinol**. 14, 691–695.
- Bennett, M.F. & Harbottle, J.A., 1968. The effects of hydrocortisone on the blood of tadpoles and frogs, *Rana catesbeiana*. **Biol. Bull**. 135, 92-95.
- 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**. 80, 233-237.

- 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. **P Natl Acad Sci-Biol.** 95, 9031-9036.
- Breen, K.M., Karsch, F.J., 2006. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. **Front Neuroendocrin.** 27, 233–245.
- 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.
- Burmeister, S., Somes, C., Wilczynski, W., 2001. Behavioral and hormonal effects of exogenous vasotocin and corticosterone in the green treefrog. **Gen Comp Endocr.** 122, 189–197.
- Buxton, O. M., Frank, S. A., L’Hermite-Baleriaux, M., Leproult, R., Turek, F. W., and Van Cauter, E., 1997. Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. **Am J Physiol.** 273, 536–542.
- Callard, G.V., 1975. Control of the interrenal gland of the freshwater turtle *Chrysemys picta* in vivo and in vitro. **Gen. Comp. Endocrinol.** 25, 323-331.
- Coddington, E.J. & Cree A., 1995. Effect of acute captivity stress on plasma concentrations of corticosterone and sex steroids in female whistling frogs, *Litoria ewingi*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 100, 33-38.



- Couto-Moraes, R., Palermo-Neto, J., Markus, R.P., 2009. The Immune–Pineal Axis Stress as a Modulator of Pineal Gland Function. **Neuroimmunomodulat.** 1153, 193–202
- 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*). **Philos T Roy Soc B.** 351, 1539- 1557.
- 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.
- Dhabhar, F.S., 1996. Stress-induced enhancement of antigen-specific, cell-mediated immunity: The role of hormones and leukocyte trafficking. Doctoral Dissertation, Laboratory of Neuroendocrinology, The Rockefeller University, New York.
- Dhabhar, F.S. & McEwen, B.S., 1996. Stress-induced enhancement of antigen specific cell-mediated immunity. **J. Immunology.** 156, 2608-2615.
- 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. Immunology.** 157, 1638–1644.
- Dhabhar, F.S., 1998. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. **Ann NY Acad Si.** 840, 359-372.
- 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.

- 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.
- Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D., 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Trop.** 78, 103–116.
- Dobson, A. & Foufopoulos, J., 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. **Philos T Roy Soc B.** 356, 1001–1012.
- Elenkov, I.J. & Chrousos, G.P., 1999. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. **Trends Endocrin Met.** 10, 359–368.
- Emerson, S.B., 2001. Male advertisement calls: behavioral variation and physiological processes. In: **Anuran Communication**, M.J. Ryan (ed.). Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Faivovich, J., C.F.B. Haddad, P.C.A. Garcia, D.R. Frost, J.R. Campbell e W.C. Wheeler., 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hyliinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **B Am Mus Nat Hist.** 294, 1-240.
- Fernandes, P.A.C.M., 2009. Regulação da produção hormonal da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Fisher, J.W., 1958. Increase in circulating red cell volume of normal rats after treatment with hydrocortisone or corticosterone. **Exp Biol Med.** 97, 502–5.
- Gist, D.H. & Kaplan, M.L., 1976. Effects of stress and ACTH on plasma corticosterone levels in the caiman *Caiman crocodilus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 28, 413-419.
- Gobbetti, A., and Zerani, M., 1996. Possible mechanism for the first response to short captivity stress in the water frog, *Rana esculenta*. **J Endocrinol.** 148, 233–239.

- 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, D.O., Jones, R.E. (Eds.), *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles*. Plenum, New York, pp. 461–503.
- Guillette, L., Cree, A., Rooney, A., 1995. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology, and intermediary metabolism. In: Warwick, C., Frye, F., Murphy, J. (Eds.), *Health and Welfare of Captive Reptiles*. Chapman and Hall, London, pp. 32–81.
- Gwinner, E., 1996. Circadian and circannual programmes in avian migration. **J Exp Biol.** 199, 39–48.
- Homan, R.N., Reed, J.M., Romero, L.M., 2003. Corticosterone concentrations in free-living spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 130, 165-171.
- Janin, A., Léna, J.-P., 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. **Conser Biol.** 26, 923–931.
- Jessop, T.S., Colin, J.L., Whittier, J.M., 2002. Nocturnal Activity in the Green Sea Turtle Alters Daily Profiles of Melatonin and Corticosterone. **Horm Behav.** 41, 357–365.

- Kinney, K.S., Austin, C.E., Morton, D.S., Sonnenfield, G., 1999. Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. **Microb Pathogenesis**. 26, 85-91.
- Knapp, R. & Moore, M.C., 1997. Male morphs in tree lizards have different testosterone responses to elevated levels of corticosterone. **Gen. Comp. Endocrinol.** 107, 273–279.
- Lance, V. A. & Elsey, R. M., 1986. Stress-induced suppression of testosterone secretion in male alligators. **J Exp Zool.** 239, 241–246.
- Lance, V.A., 1990. Stress in reptiles, in: Eppler, A., Scanes, C.G., Stetson, M.H. (Eds.), *Prospects in Comparative Endocrinology*, Wiley-Liss, New York. pp. 461–466.
- Lance, V.A. & Lauren, D., 1984. Circadian variation in plasma corticosterone in the American alligator, *Alligator mississippiensis*, and the effects of ACTH injections. **Gen. Comp. Endocrinol.** 54, 1-7.
- Leary, C. J., Garcia, A. M., Knapp, R., 2006. Elevated corticosterone levels elicit non-calling mating tactics in male toads independently of changes in circulating androgens. **Horm Behav.** 49, 425–432.
- Leboulenger, F., Delarue, C., Tonon, M.C., Jegou, S., Leroux, P., and Vaudry, H., 1979. Seasonal study of the interrenal function of the European green frog, in vivo and in vitro. **Gen. Comp. Endocrinol.** 39, 388–396.
- Licht, P., McGreery, B.R., Barnes, R., Pang, R., 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 50, 124–145.
- Lopes, C., Mariano, M. & Markus, R.P., 2001. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. **Inflamm Res.** 50, 6-11.

- Lutterschmidt, D.I., LeMaster, M.P., Mason, R.T., 2004. Effects of melatonin on the behavioral and hormonal responses of red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*) to exogenous corticosterone. **Horm Behav.** 46, 692–702.
- Maestroni, G.J.M., Conti, A., Pierpaoli, W., 1986. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. **J Neuroimmunol.** 13, 19–30.
- Malisch, J.L., Saltzman, W., Gomes, F.R., Rezende, E.L., Jeske, D.R., Garland Jr., T., 2007. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. **Physiol Biochem Zool.** 80, 146-156.
- Marler, C.A. & Ryan, M.J., 1996. Energetic constraints and steroid hormone correlates of male calling behavior in the túngara frog. **J Zool.** 240, 397–409.
- Martin, B.L., 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. **Gen. Comp. Endocrinol.** 163, 70-76.
- Martins, M. & Haddad, C.F.B., 1988. Vocalizations and reproductive behavior in the Smith Frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). **Amphibia- Reptilia.** 9, 49-60.
- Martins, M., 1993. Observations on nest dynamics and embryonic and larval development in the nest building gladiator frog, *Hyla faber*. **Amphibia-Reptilia.** 14, 411421.
- Martins, M., Pombal Jr, J.P., Haddad, C.F.B., 1998. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the nest building gladiator frog, *Hyla faber*. **Amphibia- Reptilia.** 19, 65-73.

- McEwen, B.S. & Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Horm Behav.** 43, 2–15.
- Meints, R.H. & Carver, F.J., 1973. Triiodothyronine and hydrocortisone effects on *Rana pipiens* erythropoiesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 21, 9-15.
- 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.
- Monteiro, S.C.G., 2013. Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824). Dissertação e Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Montelone, P., Maj, M., Fusco, M., Orazzo, C., and Kemali, D., 1990. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. **Life Sci.** 47, 1989–1995.
- Moore, F.L. & Miller, L.J., 1984. Stress-induced inhibition of sexual behavior: Corticosterone inhibits courtship behaviors of a male amphibian (*Taricha granulosa*). **Horm Behav.** 18, 400-410.
- 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.
- Moore, I.T. & Jessop, T.S., 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. **Horm Behav.** 43, 39–47.

- Mosconi, G., Palermo, F., Carotti, M., Kikuyama, S., Yamamoto, K., Polzonetti-Magni, A. M., 2006. Neuroendocrine modulation of stress response in the anuran, *Rana esculenta*. **Amphibia-Reptilia**. 27, 401–408.
- 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., Molinia, F.C., Cockren, J.F., Hero, J.M., 2012. Changes in urinary testosterone and corticosterona metabolites during short-term confinement with repeated handling in wild male cane toads (*Rhinella marina*). **Aust J Zool**.59, 264–269.
- Narayan, E.J., Cockrem, J.F., Hero, J.M., 2013. Changes in serum and urinary corticosterone and testosterone during short-term capture and handling in the cane toad (*Rhinella marina*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 191, 225–230
- Norris, D.O., 2007. Comparative aspects of vertebrate reproduction. In: *Vertebrate Endocrinology*, Norris, D. O. Quarta edição Ed. Elsevier. pp. 371- 426.
- Orchinik, M., Licht, P., Crews, D., 1988. Plasma steroid concentrations change in response to sexual behavior in *Bufo marinus*. **Horm Behav.** 22, 338- 350.
- Orchinik, M., Murray, T.F., Moore, F.L., 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. **Science.** 252, 1848-1851.
- Ortega, E., 1994. Influence of exercise on phagocytosis. **Int J Sports Med.** 15, 172–178.
- Ortega, E., Rodriguez, A.B., Barriga, C., Forner, M.A., 1996. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as mediators of stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. **Int J Sports Med.** 17, 149–155.

- Paolucci, M., Esposito, V., Difiore, M. M., and Botte, V., 1990. Effects of short postcapture confinement on plasma reproductive hormone and corticosterone profiles in *Rana esculenta* during the sexual cycle. **B Zool.** 57, 253–259.
- Preest, M.R., Cree, A., Tyrrell, C.L., 2005. ACTH-induced stress response during pregnancy in a viviparous gecko: no observed effect on offspring quality. **J Exp Zool.** 303A, 823-835.
- Peterson, J.D., Steffen, J.E., Reinert, L.K., Cobine, P.A., Appel. A., Rollins-Smith, L., Mendonça, M.T., 2013. Host stress response is important for the pathogenesis of the deadly amphibian disease, chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. *Plos One* 8(4): e62146.
- Pough, F.H., W.E. Magnusson, M.J. Ryan, K.D. Wells & T.L. Taigen., 1992. Behavioral energetics. In: *Environmental Physiology of Amphibians*. M.E. Feder & W.W. Burggren (eds.). University of Chicago Press, Chicago. pp. 395-436.
- Rachowicz, L.J., Hero, J., Alford, R.A., Taylor, J.W., Morgan, J.A.T., 2005. The Novel and Endemic Pathogen Hypothesis: Competing Explanations for the Origin of Emerging Infectious Diseases of Wildlife. **Conserv Biol.** 19, 1441– 1448.
- Ricciardella, L.F., Bliley, J.M., Feth, C.C., Woodley, S.K., 2010. Acute stressors increase plasma corticosterone and decrease locomotor activity in a terrestrial salamander (*Desmognathus ochrophaeus*). **Physiol Behav.** 101, 81-86.
- Rivier, C. & Rivest, S., 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic–pituitary– gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biol Reprod.** 45, 523–532.
- Rodriguez, A.B., Marchena, J.M., Nogales, G., Durán, J., Barriga, C., 1999. Correlation between circadian rhythm of melatonin and the phagocytosis and superoxide anion levels in ring dove heterophils. **J Pineal Res.** 26, 35– 42.



- Rodriguez, A.B., Terrón, M.P., Durán, J., Ortega, E., Barriga, C., 2001. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone affect phagocytosis and oxidative metabolism of ring dove heterophils. **J Pineal Res.** 31, 31–38.
- Rogers, N., Van den Heuvel, C., Dawaon, D., 1997. Effect of melatonin and corticosteroid on in vitro cellular immune function in humans. **J Pineal Res.** 22, 75–80.
- Romero, L.M., 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Ecol Evolut.** 19, 249-255.
- Romero, L.M. & Reed, J.M., 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comp Biochem Phys A.** 140, 73-79.
- Romero, L.M. & Wikelsky, M., 2006. Diurnal and nocturnal differences in hypothalamic- pituitary- adrenal axis function in Galapagos marine iguanas. **Gen. Comp. Endocrinol.** 145, 177-181.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Muck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr Rev.** 21, 55-89.
- Sapolsky, R.M., 2002. Endocrinology of the stress-response. In: *Behavioral Endocrinology*, 2<sup>o</sup> edition. Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D. e M.M. McCarthy (eds.). The MIT Press.
- Sharp, C. & Parry-Billings, M., 1992. Can exercise damage your health? **New Sci.** 92, 33–37.
- Sterberg, E.M., 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nat Rev Immunol.** 6, 318-328.
- 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 Dis.** 35, 49-57.

- Tharp G.D., 1975. The role of glucocorticoids in exercise. **Med Sci Sports Exer.** 7, 6-11.
- Terry, W. C., 2006. Hematologia de Anfíbios. In Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária, Mary Anna Trall, D. V. M., M. S., D. A. C. V. P.. Ed. Roca. pp. 277-281.
- Tilbrook, A., Turner, A., Clarke, I., 2000. Effects of stress on reproduction in nonrodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. **Rev Reprod.** 5, 105–113.
- Tsuchiya, T. & Horii, I., 1995. Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male Syrian hamsters. **Psychoneuroendocrino.** 20, 95–102.
- Tyrell, C.L. & Cree, A., 1998. Relationships between corticosterona concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (tuatara, *Sphenodon punctatus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 110, 97–108.
- Van-Reeth, O., Sturis, J., Byrne, M. M., Blackman, J. D., L’Hermite-Baleriaux, M., Leproult, R., Oliner, C., Refetoff, S., Turek, F. W., and Van-Cauter, E., 1994. Nocturnal exercise phase delays circadian rhythms of melatonin and thyrotropin secretion in normal men. **Am J Physiol.** 266, 964–974.
- Wikelsky, M. & Cooke, S.J., 2006. Conservation physiology. **Ecol Evolut.** 21, 38-46.
- Wingfield, J.C. & Romero, L.M., 2001. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates, in: McEwen, B.S., Goodman, H.M. (Eds.), Handbook of Physiology: *The Endocrine System*, Vol. IV, Section 7, Oxford University Press, New York, pp. 211–234.
- Wingfield, J.C. & Sapolsky, R.M., 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. **J Neuroendocrinol.** 15, 711–724.

- Wells, K.D., 2001. The energetics of calling in frogs. In: M.J. Ryan (ed.). *Anuran communication*. Smithsonian Institution Press, Washington and London. pp. 45-60.
- Woodley, S.K. & Lacy, E.L., 2010. An acute stressor alters steroid hormone levels and activity but not sexual behavior in male and female Ocoee salamanders (*Desmognathus ocoee*). **Horm Behav.** 58, 427-432.
- Wright, M.L., Rzasa, B.A., Weir, R.J., Babski, A.M., 1999. Influence of Cortisol on the Larval Bullfrog Thyroid Axis *in Vitro* and *in Vivo* and on Plasma and Ocular Melatonin. **Gen. Comp. Endocrinol.** 116, 249–260.
- Yajurvedi, H. N. & Nijagal, B. S., 2000. Corticosterone inhibits normal and FSH-induced testicular recrudescence in the lizard, *Mabuya carinata*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 120, 283– 288.