

Débora Meyer de Almeida Prado

Efeitos do tratamento crônico com corticosterona e da condição corpórea na imunidade, deposição de gordura e comportamento alimentar de fêmeas de lagartos (*Tropidurus catalanensis*)

Effects of chronic corticosterone treatment and body condition on immunity, fat deposition and feeding behaviour of female lizards (*Tropidurus catalanensis*)

São Paulo

2023

Débora Meyer de Almeida Prado

Efeitos do tratamento crônico com corticosterona e da condição corpórea na imunidade, deposição de gordura e comportamento alimentar de fêmeas de lagartos (*Tropidurus catalanensis*)

Effects of chronic corticosterone treatment and body condition on immunity, fat deposition and feeding behaviour of female lizards (*Tropidurus catalanensis*)

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes

Coorientadora: Dra. Carla B. Madelaire

São Paulo

2023

Ficha Catalográfica

Meyer de Almeida Prado, Débora

Efeitos do tratamento crônico com corticosterona e da condição corpórea na imunidade, deposição de gordura e comportamento alimentar de fêmeas de lagartos (*Tropidurus catalanensis*) / Meyer de Almeida Prado, Débora; orientador Ribeiro Gomes, Fernando; coorientadora B. Madelaire, Carla.

70 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de pós-graduação em Fisiologia Geral.

1. Glicocorticoides 2. Répteis 3. Imunidade 4. Corpos gordurosos 5. BKA
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes
Orientador

*“You do not have to be good.
You do not have to walk on your knees
for a hundred miles through the desert repenting.
You only have to let the soft animal of your body
love what it loves.
Tell me about despair, yours, and I will tell you mine.
Meanwhile the world goes on.
Meanwhile the sun and the clear pebbles of the rain
are moving across the landscapes,
over the prairies and the deep trees,
the mountains and the rivers.
Meanwhile the wild geese, high in the clean blue air,
are heading home again.
Whoever you are, no matter how lonely,
the world offers itself to your imagination,
calls to you like the wild geese, harsh and exciting -
over and over announcing your place
in the family of things.”*

Mary Oliver,
Wild Geese

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Gisele e José Paulo, por todo apoio e suporte durante o período do mestrado, mas, principalmente, durante a vida. Por sempre acreditarem em meus sonhos e apoiarem minhas buscas, e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Vocês são a base de tudo que construí.

Aos meus orientadores, Carla e Fernando, pela oportunidade de aprendizado e início da carreira como pesquisadora desde a iniciação científica, e pela continuidade da parceria no mestrado. Muito obrigada por estimularem minha independência, e ao mesmo tempo por sempre estarem presentes, guiando meus aprendizados e a resolução de desafios e garantindo a integridade e qualidade do trabalho. Vocês são incríveis e sou muito grata por ter trilhado esse caminho com vocês.

A Aymam e ao Alan, meus colaboradores nesse trabalho. Vocês foram imprescindíveis para o meu aprendizado e para a realização dos experimentos. Muito obrigada, por tudo.

A todos os meus amigos, que me auxiliaram direta e indiretamente durante o período do mestrado. Vocês foram essenciais para a realização dos experimentos e para a manutenção da minha saúde mental durante um período tão delicado. Muito obrigada a cada um que esteve ao meu lado.

Ao meu namorado, Humberto, por estar ao meu lado nos momentos difíceis e por me incentivar, diariamente. E obrigada por comemorar comigo cada conquista.

A mim, por cada passo que eu dei para chegar até aqui. E por cada passo que darei buscando as novas etapas da minha carreira como cientista. Sei que me preparei bastante para chegar até aqui, e que esse mestrado me rendeu muitos aprendizados que levarei para a vida toda.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** através de uma bolsa de estudos no país, nível mestrado, concedida à aluna Débora Meyer de Almeida Prado (#2020/12775-0) e pelo auxílio regular (#2021/10877-3) liderado pelo professor Dr. Fernando Ribeiro Gomes.

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

Resumo Geral

Em diferentes estágios da história de vida, os animais precisam manter a homeostase frente a eventos previsíveis, imprevisíveis e/ou desafiadores. Os glicocorticoides (GC), hormônios liberados em resposta à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais/inter-renais (HHA/HHI), promovem diversos ajustes comportamentais e fisiológicos diariamente; e para restaurar o equilíbrio, após estímulos estressores. Quando os GC são elevados por um período estendido e em concentrações altas, caracterizando-se uma exposição crônica, podem levar à efeitos deletérios à fisiologia animal, como o acúmulo de tecido adiposo, mudanças no comportamento alimentar e supressão da imunidade. Buscamos elucidar os efeitos da exposição crônica à corticosterona (CORT) e da condição corpórea (BI) na deposição de gordura, no comportamento alimentar e na imunidade de fêmeas de *Tropidurus catalanensis*. Trinta animais foram divididos em três grupos: 1. Controle (nenhum procedimento experimental foi realizado); 2. Implante Vazio (animais receberam cirurgicamente um implante silástico vazio); e 3. Implante CORT (animais receberam cirurgicamente um implante silástico com CORT). Amostras de sangue foram coletadas ao longo do experimento para determinar as concentrações plasmáticas de CORT, as contagens total e diferencial de leucócitos, a capacidade bactericida plasmática (BKA), e o título de hemaglutinação de hemácias. O desafio imunológico da fitohemaglutinina (PHA) foi realizado para avaliar as respostas imunes inata e adaptativa. O comportamento alimentar e a massa de corpos gordurosos também foram avaliados. Após a implantação, animais tratados com CORT mantiveram a massa corpórea estável ao longo das semanas de cativeiro, enquanto os grupos Controle e Implante Vazio apresentaram perda de peso. Também houve uma relação positiva entre BI e corpos gordurosos, na qual animais tratados com CORT apresentaram maior deposição de gordura. A imunidade e o comportamento alimentar não foram afetados pelo tratamento com CORT.

General Abstract

In different life history stages, animals must maintain homeostasis through predictable, unpredictable and/or challenging events. Glucocorticoids (GC), hormones released in response to hypothalamus-pituitary-adrenal/interrenal (HPA/HPI) axis activation, promote various behavioural and physiological adjustments on a daily manner; and in order to restore balance, after facing stressors. When GC are elevated for an extended period and in high concentrations, characterizing a chronic exposure, it can lead to deleterious effects on animals' physiology, such as accumulation of fat bodies, changes in feeding behaviour and suppression of immune function. We aim to elucidate the effects of chronic corticosterone (CORT) exposure and body condition index (BI) in fat deposition, feeding behaviour and immune function in *Tropidurus catalanensis*' females. Thirty animals were divided in three groups: 1. Control (no experimental procedure was performed); 2. Empty Implant (animals surgically received an empty silastic tube); and 3. CORT Implant (animals surgically received one silastic tube filled with CORT). Blood samples were collected throughout the experiment to assess CORT plasma levels, total and differential leukocyte count, bacterial killing ability (BKA), and hemagglutination titer. An immune challenge using phytohemagglutinin (PHA) was conducted to measure innate and adaptive immune response. Feeding behaviour and fat bodies were also evaluated. After implantation, CORT treated animals maintained a stable body mass through weeks of captivity, while Control and Empty Implant groups displayed weight loss. There was also a positive relation between BI and fat bodies, with CORT treated animals presenting higher fat bodies deposition. No effects of CORT treatment were observed on immune response or feeding behaviour.

Introdução Geral

Glicocorticoides e metabolismo

Os glicocorticoides (GC) são hormônios de produção e secreção controlada pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenais/Interrenais (HHA/HHI), cujas concentrações têm um padrão de variação diária (Abe et al., 1979; Chung et al., 2011) e sazonal (Romero, 2002; Lattin & Romero, 2015). GC modulam uma miríade de processos fisiológicos essenciais, incluindo o metabolismo energético de vertebrados, apresentando um papel no ajuste das concentrações de glicose no sangue e nos tecidos, através da promoção da gliconeogênese (Sapolsky et al., 2000). Estes hormônios também estimulam a gliconeogênese no fígado e promovem a lipólise no tecido adiposo, promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol (Kuo et al., 2015). Além disso, promovem proteólise, além da inibição momentânea da síntese proteica, para que haja uma reserva imediata de gorduras e aminoácidos (Munck & Náráy-Fejes-Tóth, 1995). Concentrações basais de GC também são associadas ao apetite e ao forrageamento (Sapolsky et al., 2000). Já a elevação sazonal de GC é associada à estação reprodutiva em diversas espécies (Moore & Jessop, 2003), assim como à sinalização e à transição entre estágios da história de vida (Crespi et al., 2013).

Outro papel importante e bem estudado dos GC é a coordenação de respostas fisiológicas e comportamentais às mudanças ambientais imprevisíveis e/ou desafiadoras (Wingfield et al., 1998), comumente chamadas de resposta ao estresse (Levine, 2005). De acordo com o modelo do escopo reativo (Romero et al., 2009), todos os animais apresentam a capacidade de responder a estressores, caracterizando uma homeostase reativa. Esta resposta é considerada adaptativa, na qual o organismo modula diversos parâmetros de sua fisiologia necessários para lidar com as mudanças e ameaças ambientais (Romero et al., 2009). Durante a resposta a estressores, os animais experienciam uma elevação das concentrações plasmáticas de GC para além das concentrações diárias e sazonais (Sapolsky et al., 2000). Essa elevação é necessária para promover ajustes fisiológicos e comportamentais, que levam ao reestabelecimento do equilíbrio homeostático (Wingfield & Romero, 2000; McEwen & Wingfield, 2003).

Entretanto, quando há uma sobrecarga dessa homeostase reativa (ex.: durante um estresse prolongado), o estresse passa a ter efeitos deletérios para a saúde do animal (Romero et al., 2009). Essa sobrecarga parece estar relacionada ao tipo de receptor

ativado: receptor de glicocorticoide (GR) ou receptor de mineralocorticoide (MR). A afinidade do receptor MR é mais alta, mediando a maioria dos efeitos relacionados às concentrações diárias e sazonais de GC. Quando os receptores MR atingem sua saturação (frente a concentrações elevadas de GC, geralmente experienciadas durante a resposta ao estresse [Sapolsky et al., 2000]), os receptores GR começam a captar o hormônio e são responsáveis pela maioria dos efeitos deletérios associados às concentrações elevadas de GC (de Kloet et al., 2019).

No caso destes efeitos deletérios no metabolismo, as concentrações elevadas de GC por um período estendido comumente levam à resistência insulínica (Beaupere et al., 2021). Além disso, os GC atuam de forma sinérgica com a insulina, resultando em maior acúmulo de tecido adiposo através do estímulo da lipogênese (Dubuc, 1992). Diversos estudos mostram a associação do acúmulo de tecido adiposo e resistência insulínica às concentrações elevadas de GC (Wingfield and Silverin, 1986; Yuan et al., 2008).

Os hormônios GC também são associados à alimentação, como mencionado acima. Além de estimularem o forrageamento (busca por alimento), também resultam em um aumento de apetite, caracterizado por maior ingestão alimentar (Leibowitz & Hoebel, 1997). Um artigo de revisão de 2022, de Bakshi e coautores, mostra detalhadamente as relações entre mudanças nas concentrações plasmáticas de leptina (um hormônio associado à regulação do apetite pelo alimento) e mudanças nas concentrações de GC. Por exemplo, em mamíferos, um tratamento com GC resultou em aumento nas concentrações de leptina (Lewandowski et al., 2001), o que parece estar relacionado a um mecanismo de balancear a massa corporal através da ingestão alimentar (Friedman, 2002). Sabe-se também que a expressão da leptina aumenta dependendo das concentrações plasmáticas de insulina (Saladin et al., 1995), o que indica a relação entre estes hormônios. Esses estudos ainda são limitados em vertebrados não-mamíferos (revisado em Bakshi et al., 2022), porém, estudos em peixes mostram que um tratamento com cortisol resultou em um aumento da expressão hepática de leptina através de receptores de GC (Madison et al., 2015; Conde-Sieira et al., 2018). Já em lagartos, estudos mostram uma relação entre concentrações plasmáticas de leptina e de glicose, onde maiores concentrações de leptina levam à redução das concentrações de glicose no sangue (Ping et al., 2016). Sendo assim, a

leptina, a insulina e os hormônios GC parecem atuar de forma sinérgica na regulação do metabolismo energético.

Glicocorticoides e imunidade

Além dos seus efeitos no metabolismo, os hormônios GC também apresentam um importante papel imunomodulatório. Estudos realizados em anfíbios anuros ilustra a relação entre GC e imunidade, nos quais a realização de desafios imunológicos resultaram na elevação das concentrações plasmáticas de GC (Bastos et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Titon Jr et al., 2021). Sabe-se também que o tráfico de leucócitos pode ser afetado pelas concentrações elevadas de GC, resultando em uma redução da quantidade circulante de linfócitos e eosinófilos (Cronstein et al., 1992). Essa redução é acompanhada de um aumento da quantidade de neutrófilos ou heterófilos (Davis & Maerz, 2008; Davis et al., 2008; Tuckermann et al., 2005). No entanto, o papel dos GC na resposta imune é complexo (Dhabhar, 2009; Assis et al. 2015), e depende do padrão temporal da exposição, da concentração do hormônio e do contexto em que o animal está inserido (como por exemplo o estágio da história de vida, o sexo, o ambiente e a espécie [Neuman-Lee & French, 2017]).

Geralmente, concentrações basais de GC ou elevadas de forma aguda ou pontual tendem a aumentar e acelerar a resposta imune (Dhabhar, 2009; Madelaire et al., 2019), preparando os organismos para a cicatrização e ao combate de infecções (Deak et al., 1999; Martin, 2009). Elevações plasmáticas de GC já foram associadas ao aumento da atividade fagocitária em mamíferos e anfíbios (Zhou et al., 2010; Assis et al., 2017; Cain and Cidlowski, 2017). Estudos também mostram a relação entre concentrações de GC e capacidade bactericida plasmática em répteis, em que animais com maiores concentrações de GC apresentaram melhor capacidade bactericida plasmática (Spence et al., 2020). Os GC também atuam na resolução inflamatória, inibindo a síntese de citocinas e mediadores pró-inflamatórios – restaurando o equilíbrio homeostático e prevenindo danos teciduais (Fernandes et al., 2009). Dentro deste contexto, estudos mostram que a ativação do GR pode resultar na supressão da expressão de IL-6 e C3 (Surjit et al., 2011), o que reforça esse papel de redução da atividade inflamatória.

Por outro lado, diversos estudos mostram que concentrações de GC cronicamente elevadas resultam em imunossupressão (French et al., 2008, 2006;

Martin, 2009; Titon et al., 2019). Nesse contexto, estudos mostram que em linfócitos, os GC podem suprimir a diferenciação de células em Th1 e reduzir a produção de IFN- γ pelas células Th1, linfócitos T-CD8 e *Natural Killers*, levando à inibição das respostas citotóxicas (Franchimont et al., 2000; Liberman et al., 2007; Chen et al., 2018). Além disso, um estudo em lagartos mostrou que uma resposta ao estresse induzida pela restrição da mobilidade resultou em aumento das concentrações plasmáticas de GC e, conseqüentemente, comprometeu a capacidade de cicatrização de feridas dos animais (French et al., 2006).

Relação da condição corpórea com o metabolismo e imunidade

Há pistas que indicam que a condição corpórea influencia o metabolismo, comportamento alimentar e a resposta imune de vertebrados. Um estudo realizado em três espécies de escamados (*Liasis fuscus*, *Tropidonophis mairii* e *Stegonotus cucullatus*) mostrou a relação entre frequência de alimentação e condição corpórea, sendo que animais que se alimentaram com menor frequência exibiram pior condição corpórea, enquanto animais que se alimentam mais frequentemente, apresentaram melhores índices de condição corpórea (Brown et al., 2002). Outros estudos em répteis e mamíferos mostram que a medida de condição corpórea está relacionada à quantidade de tecido adiposo ou reservas que os animais apresentam, o que significa que animais com melhores condições corpóreas tendem a apresentar maior quantidade de gordura corporal (McCaffrey et al., 2023; Labocha et al., 2014, Alapati et al., 2010).

Além disso, estudos mostram que a condição corpórea pode ser decisiva para estimar a capacidade de resposta imunitária dos animais. Por exemplo, Meylan et al. (2013) mostrou que lagartos da espécie *Zootoca vivipara* com maior tamanho corpóreo e condição corpórea, quando imunologicamente desafiadas com células de carneiro, mantiveram uma taxa metabólica elevada. Por outro lado, lagartos com menor tamanho corpóreo e condição corpórea apresentaram uma redução da taxa metabólica e da resposta imunológica (Meylan et al., 2013). O desafio imunológico também resultou em um aumento da resposta à fitohemaglutinina, mas somente em indivíduos com maior condição corpórea (Meylan et al., 2013).

Outro estudo realizado em anfíbios mostra essa relação entre imunidade e condição corpórea, em associação aos GC. Titon et al. (2018) realizaram um estudo para avaliar os efeitos da manutenção em cativeiro nas concentrações de GC, na

condição corpórea e na imunidade inata de sapos (*Rhinella icterica*). Entre outros resultados, observou-se que animais com condição corpórea elevada apresentaram uma relação positiva entre concentrações plasmáticas de GC e capacidade bactericida plasmática, enquanto animais com uma condição corpórea mais baixa apresentaram uma relação negativa entre GC e capacidade bactericida plasmática (Titon et al., 2018). Uma relação parecida também foi observada em répteis, citada anteriormente, onde animais com maiores concentrações de GC apresentaram melhor capacidade bactericida plasmática – e esta relação foi mais pronunciada em animais com melhores condições corpóreas (Spence et al., 2020).

***Tropidurus catalanensis* como modelo de estudo sobre os efeitos dos GC em aspectos integrados de fisiologia e comportamento**

A espécie utilizada como modelo, *Tropidurus catalanensis* é heliófila, saxícola ou arborícola, caracterizada pela presença de escamas quilhadas, membros bem desenvolvidos, forte dimorfismo sexual na coloração e tamanho corpóreo (Achaval e Olmos, 2007) e cauda mais comprida que o corpo, normalmente chegando a 65 mm de SVL para fêmeas adultas (Wiederhecker et al., 2009). É uma espécie distribuída pela América do Sul, abrangendo o nordeste da Argentina, noroeste do Uruguai, sul do Paraguai e sul do Brasil (Saraiva Kunz e Borges Martins, 2013), possuindo uma população considerável no território de São Paulo. Apresenta um padrão de reprodução sazonal, com início em setembro e fim em janeiro (Oliveira, 2015).

Objetivos

Considerando os amplos efeitos dos GC na fisiologia dos vertebrados, o trabalho em questão busca elucidar as relações entre a corticosterona (CORT, principal GC em répteis [Koren et al., 2012]), a condição corpórea, a deposição de gorduras, o comportamento alimentar e a imunidade de fêmeas de *Tropidurus catalanensis*.

Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos do tratamento crônico com a CORT nas funções imunitárias de fêmeas de *T. catalanensis*, através da avaliação da capacidade bactericida plasmática, da contagem total e diferencial de

leucócitos, da resposta à fitohemaglutinina e da hemaglutinação de hemácias.

2. Avaliar os efeitos do tratamento crônico com a CORT na deposição de gordura e no comportamento alimentar de fêmeas de *T. catalanensis*.
3. Avaliar o papel da condição corpórea em determinar como os parâmetros imunológicos, a deposição de gordura e o comportamento alimentar se relacionam com as concentrações plasmáticas de CORT em fêmeas de *T. catalanensis*.

Hipóteses e predições

1. Hipotetiza-se que o tratamento crônico com a CORT resultará na piora das funções imunitárias dos indivíduos, caracterizada por menor capacidade bactericida plasmática, redução da quantidade total de leucócitos, menor hemaglutinação de hemácias e menor edema em resposta à fitohemaglutinina; e que além disso, afetará o perfil leucocitário, caracterizado por maior razão heterófilo:linfócito.
2. Hipotetiza-se que o tratamento crônico com a CORT resulte em aumento das reservas energéticas, observada por maior ingestão de alimentos e maior deposição de gordura corpórea.
3. Hipotetiza-se que a condição corpórea influencie na resposta dos animais ao tratamento, observando-se que animais com maior condição corpórea apresentarão melhor resposta imune, maiores ingestão alimentar e deposição de gordura.

Conclusões Gerais

Esse trabalho mostra que o tratamento crônico com a CORT estimulou a manutenção da massa corpórea ao longo das semanas de cativeiro, visto que após a cirurgia de implantação, os animais tratados com o hormônio não perderam massa, em comparação aos grupos Controle e Implante Vazio – que perderam massa ao longo de todas as semanas do experimento. Além disso, mostramos um possível papel da CORT no estímulo da deposição de corpos gordurosos, o que parece ser um mecanismo de reserva energética. Essa reserva energética pode ter sido importante para proteger os animais dos efeitos deletérios relacionados à concentrações crônicas de CORT, já que o tratamento não afetou parâmetros imunitários nem o comportamento alimentar dos animais. Pesquisas futuras serão importantes para elucidar as relações entre concentrações plasmáticas de CORT, imunidade e metabolismo de *T. catalanensis*.

Referências Bibliográficas

Abe, K., Kroning, J., Greer, M.A., Critchlow, V. (1979). Effects of Destruction of the Suprachiasmatic Nuclei on the Circadian Rhythms in Plasma Corticosterone, Body Temperature, Feeding and Plasma Thyrotropin. *Neuroendocrinology*. 29. 119-31. 10.1159/000122913.

Alapati, A., Reddy, K., Jeepalyam, S., Rangappa, S., Yemireddy, K. (2010). Development of the body condition score system in Murrah buffaloes: Validation through ultrasonic assessment of body fat reserves. *Journal of veterinary science*. 11. 1-8. 10.4142/jvs.2010.11.1.1.

Assis, V.R., Titon, S.C.M., Barsotti, A.M.G., Titon Jr., B., Gomes, F.R. (2015). Effects of acute restraint stress, prolonged captivity stress and transdermal corticosterone application on immunocompetence and plasma levels of corticosterone on the cururu toad (*Rhinella icterica*). *PLoS One* 10 (4), e0121005.

Assis, V.R., 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.* 327, 200–213.

Bakshi, A., Singh, R., Rai, U. (2022). Trajectory of leptin and leptin receptor in vertebrates: Structure, function and their regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 257. 110652. 10.1016/j.cbpb.2021.110652.

Bastos, P.R.O., Titon, S.C.M., Titon, J.B., Gomes, F.R., Markus, R.P., Ferreira, Z.S., (2021). Daily and LPS-induced variation of endocrine mediators in cururu toads (*Rhinella icterica*). *Chronobiol. Int.* 39, 89-96.

Beaupere, C., Liboz, A., Fève, B., Blondeau, B., Guillemain, G. (2021). Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 22. 623. 10.3390/ijms22020623.

Brown, G., Shine, R., Madsen, T. (2002). Responses of three sympatric snake species to tropical seasonality in northern Australia. *Journal of Tropical Ecology*. 18. 10.1017/S0266467402002365.

Cain, D.W., Cidlowski, J.A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nature. Rev. Immunol.* 17, 233-247.

Chen, L.Y., Jondal, M., Yakimchuk, K. (2018). Regulatory effects of dexamethasone on NK and T cell immunity. *Inflammopharmacology*. 26:1331–8. doi: 10.1007/s10787-017-0418-0

Chung, S., Son, G.H., Kim, K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochimica et biophysica acta*. 1812. 581-91. 10.1016/j.bbadis.2011.02.003.

Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J.M., Soengas, J.L. (2018). Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Front. Endocrinol.* 9, 1–8.

Crespi, E. J., Williams, T. D., Jessop, T. S., Delehanty, B. (2013). Life history and the ecology of stress: how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals? *Functional Ecology*. 27, 93e106.

Cronstein, B.N.; Kimmel, S.C.; Levin, R.I.; Martiniuk, F.; Weissman, G. (1992). A mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9991–9995.

Davis, A. K.; Maerz, J. C. (2008). Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* 3, 613-617. <https://doi.org/10.1643/CP-07-133>.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>.

de Kloet, E.R.; de Kloet, S.F.; de Kloet, C.S.; de Kloet, A.D. (2019). Top-down and bottom-up control of stress-coping. *J. Neuroendocrinol.* 31, e12675.

Deak, T., Nguyen, K.T., Fleshner, M., Watkins, L.R. and Maier, S.F. (1999). Acute stress may facilitate recovery from a subcutaneous bacterial challenge. *Neuroimmunomodulation* 6, 344–354.

Dhabhar, F. S. (2009). A hassle a day may keep the pathogens away: The fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. *Integr. Comp. Biol.* 49, 215–36.

Dubuc, P. (1992). Interactions between insulin and glucocorticoids in the maintenance of genetic obesity. *Am J Physiol* 263:E550–557.

Fernandes, P.A.C.M., Bothorel, B., Clesse, D., Monteiro, A.W.A., Calgari, C., Raison, S., Simonneaux, V., Markus, R.P. (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production In Vivo. *J. Neuroendocrinol.* 21, 90–97.

Ferreira, L.F., Garcia Neto, P.G., Titon, S.C.M., Titon, B. Muxel, S.M., Gomes, F.R., Assis, V.R. (2021). Lipopolysaccharide regulates pro- and anti-inflammatory cytokines, corticosterone, and melatonin in toads. *Integr. org. biol.* 3, 1–11.

Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou YJ, Aringer M, et al. (2000). Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids, dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol.* 164:1768–74. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.1768

French, S. S., Fokidis, H. B., Moore, M. C. (2008). Variation in stress and innate immunity in the tree lizard (*Urosaurus ornatus*) across an urban–rural gradient. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 178, 997–1005.

French, S.S., Matt, K.S., Moore, M.C. (2006). The effects of stress on wound healing in male tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 128–132.

Friedman, J. (2002). The Function of Leptin in Nutrition, Weight, and Physiology. *Nutrition reviews.* 60. S1-14; discussion S68. 10.1301/002966402320634878.

Koren, L.; Whiteside, D.; Fahlman, A.; Ruckstuhl, K.; Kutz, S.; Checkley, S.; Dumond, M.; Wynne-Edwards, K. (2012). Cortisol and corticosterone Independence in cortisol-dominant wildlife. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177, 113-119.

Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. (2015). Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol.* 872:99–126. doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8_5

Labocha, M., Schutz, H., Hayes, J. (2014). Which body condition index is best?. *Oikos.* 123. 10.1111/j.1600-0706.2013.00755.x.

Lattin, C., Romero, L.M. (2014). Seasonal variation in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in metabolic tissues of the house sparrow (*Passer*

domesticus). General and Comparative Endocrinology. 214. 10.1016/j.ygcen.2014.05.033.

Leibowitz, S.F.; Hoebel, B.G. (1997). Behavioral neuroscience of obesity, in: Bray, G.A., Bouchard, C., James, W.P.T. (Eds.), Handbook of Obesity, Marcel Dekker, New York, pp. 313–358.

Levine S. (2005). Stress: an historical perspective T. Steckler, et al. (Eds.), Handbook of Stress and the Brain, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp. 3-23

Lewandowski, K.; Randevara, H.S.; O'Callaghan, C.J.; Horn, R.; Medley, G.F.; Hillhouse, E.W.; Brabant, G.; O'Hare, P. (2001). Effects of insulin and glucocorticoids on the leptin system are mediated through free leptin. Clin. Endocrinol., 54, pp. 533-539.

Liberman AC, Refojo D, Druker J, Toscano M, Rein T, Holsboer F, et al. (2007). The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. FASEB J. 21:1177–88. doi: 10.1096/fj.06-7452com

Madelaire, C.B., Cassettari, B.O., Gomes, F.R. (2019). Immunomodulation by testosterone and corticosterone in toads: Experimental evidences from transdermal application. Gen. Comp. Endocrinol. 273, 227-235.

Madison, B.N.; Tavakoli, S.; Kramer, S.; Bernier, N.J. (2015). Chronic cortisol and the regulation of food intake and the endocrine growth axis in rainbow trout. J. Endocrinol. 226, 103–119.

Martin, L. B. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. Gen. Comp. Endocrinol. 163, 70-76.

McCaffrey, K., Balaguera-Reina, S., Falk, B., Gati, E., Cole, J., Mazzotti, F. (2023). How to estimate body condition in large lizards? Argentine black and white tegu (*Salvator merianae*, Duméril and Bibron, 1839) as a case study. PloS one. 18. e0282093. 10.1371/journal.pone.0282093.

McEwen, B.S., Wingfield, J.C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. Horm. Behav. 43, 2-15.

Meylan, S., Richard, M., Bauer, S., Haussy, C., Miles, D. (2013). Costs of Mounting an Immune Response during Pregnancy in a Lizard. Physiological and biochemical zoology: PBZ. 86. 127-36. 10.1086/668637.

Moore, I. T., & Jessop, T. S. (2003). Stress, reproduction and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. Hormones and Behavior, 43, 39–47.

Munck, A.; Náray-Fejes-Tóth, A. (1995). Glucocorticoid action. Physiology. In: DeGroot LJ (ed) Endocrinology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp 1642–1656.

Neuman-Lee, L.; French, S.S. (2017). Endocrine-reproductive-immune interactions in female and male Galápagos marine iguanas. Hormones and Behavior. 88, 60-69.

Oliveira, M. R. (2015). Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o status oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae). Dissertação de mestrado (pós graduação em zoologia) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015. p. 14-49.

Ping, X.; Han, D.; Jiang, Z.; Li, C. (2016). Circadian patterns of plasma leptin, insulin and glucose concentration in the toad-headed lizard *Phrynocephalus versicolor*, Biological Rhythm Research, 47:6, 927-936, DOI: 10.1080/09291016.2016.1210283

Romero, L.M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. General and comparative endocrinology. 128. 1-24. 10.1016/S0016-6480(02)00064-3.

Romero, L.M., Dickens, M.J., Cyr, N.E., (2009). Reactive scope model—a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. Horm. Behav. 55, 375–389.

Saladin, R., de Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., Auwerx, J. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. Nature. 377. 527-9. 10.1038/377527a0.

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.

Saraiva, K. T., Borges-Martins, M. (2013). Uma nova espécie microendêmica de *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) do sul do Brasil e revalidação de *Tropidurus catalanensis* Gudynas & Skuk, 1983, Zootaxa 3681 (4), pp . 422-426

Spence, R.A., French, S.S., Hopkins, G.R., Durso, A.M., Hudson, S.B., Smith, G.D., Neuman-Lee, L.A. (2020). Long-term monitoring of two snake species reveals immune–endocrine interactions and the importance of ecological context. J. Exp. Zool. Part A 333, 744-755.

Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, et al. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*. 145:224–41. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.027

Titon, Jr.B., Titon, S.C.M., Assis, V.R., Barsotti, A.M.G., Vasconcelos-Teixeira, R., Fernandes, P.A.C., Gomes, F.R. (2021). LPS-induced immunomodulation and hormonal variation over time in toads. *J. Exp. Zool. Part A*. doi: 10.1002/jez.2474

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222856>

Tuckermann, J. P., Kleiman, A., McPherson, K. G., & Reichardt, H. M. (2005). Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 42, 71–104.

Wiederhecker, H., Pinto, A., Colli, G. (2009). Reproductive Ecology of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in the Highly Seasonal Cerrado Biome of Central Brazil. *Journal of Herpetology*. 36, 82-91.

Wingfield, J. C.; Silverin, B. (1986). Effects of corticosterone on territorial behavior of free-living male Song Sparrows, *Melospiza melodia*. *Hormones and Behavior* 20:405-417.

Wingfield, J.C., Maney, D.L., Breuner, C.W., Jacobs, J.D., Lynn, S., Ramenofsky, M. & Richardson, R.D. (1998) Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “emergency life history stage”. *American Zoologist*, 38, 191–206.

Wingfield, J.C.; Romero, L.M. (2000). Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. *Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System: Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms*. 4. 211-236.

Yuan, L.; Huameng, L.; Jiang, K.J.; Jiao, H.; Song, Z. (2008). Corticosterone administration and high-energy feed results in enhanced fat accumulation and insulin resistance in broiler chickens. *British poultry science*. 49. 487-95. 10.1080/00071660802251731.

Zhou, J.Y., Zhong, H.J., Yang, C., Yan, J., Wang, H.Y., Jiang, J.X. (2010). Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress. *Brit. J. Surg.* 97, 281–293.