

CORRELAÇÕES COMPORTAMENTAIS, FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DA CARGA PARASITÁRIA EM *RHINELLA ICTERICA* (ANURA: BUFONIDAE)

EDUARDO HERMOGENES MORETTI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Ass. Dr. Fernando Ribeiro Gomes

**BOTUCATU – SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Moretti, Eduardo Hermógenes

Correlações comportamentais, fisiológicas e morfológicas da carga parasitária em *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae) / Eduardo Hermógenes Moretti. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Fernando Ribeiro Gomes

Capes: 20100000

1. Anuro – Metabolismo. 2. Morfologia. 3. Parasito.

Palavras-chave: Anuros; Desempenho; Metabolismo; Morfologia; Parasitas.

Dedicatória

À minha família

por todo amor que
sempre transmitem,
principalmente nos dramas
da vida, quando a gente
acha que não se é amado
por ninguém;

Ao Professor Fernando R. Gomes

que considero um legítimo mestre,
capaz de passar a seu aprendiz
conhecimento de alta qualidade,
disciplina e ética. Além de ter sido muito
compreensivo em momento difíceis da
minha vida, sempre me apoiando e
ajudando, mas sem deixar de cobrar
minhas responsabilidades, como é e age
um verdadeiro mestre...Obrigado;

A todas as pessoas

que me incentivaram de forma
positiva e construtiva na elaboração do
meu no meu trabalho.

Agradecimentos

*Agradeço aos funcionários, alunos e professores
das instituições e departamentos*

*que colaboraram para o pleno desenvolvimento do meu
trabalho, seja através do apoio intelectual, laboratorial e financeiro
ou pelas novas amizades e descontrações. O desenvolvimento deste
projeto contou com o apoio das seguintes instituições:*

Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu:

*Programa de Pós-graduação em
Biologia Geral e Aplicada;
Departamento de Fisiologia;
Departamento de Morfologia;
Departamento de Parasitologia;*

Faculdade de Medicina e Veterinária – Unesp – Botucatu:

Departamento de Clínica Veterinária

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

*Bolsa de Mestrado (2009/03933-2)
Projeto Jovem Pesquisador (06/54699-1)*

Resumo	IX
---------------------	-----------

Abstract	X
-----------------------	----------

Introdução

Efeitos parasitário nas características que compõem a organização hierárquica do fenótipo do hospedeiro	02
Exemplos de efeitos parasitários no gradiente de desempenho	04
Exemplos de efeitos parasitários no gradiente de aptidão	08
<i>Rhinella icterica</i> (Anura: Bufonidae) como modelo para estudar as relações entre parasitas e organização hierárquica do fenótipo do hospedeiro	11
Objetivos	15

Metodologia

Sítio de estudo e espécie incluída	17
Dados de campo	18
Manutenção dos anuros em laboratório	18
Taxa metabólica em repouso	19
Desempenho locomotor	20
Perfil leucocitário	21
Massa dos órgãos	21
Carga parasitária	21
Análise dos resultados	22

Resultados

Dados ambientais de campo	25
Análise descritiva e alometria	25
Espécies, prevalência, intensidade média e abundância média de infecção parasitária em <i>Rhinella icterica</i>	25
Análise de componentes principais e correlações entre carga parasitária com as variáveis comportamentais, fisiológicas e morfológicas	25

Discussão	28
Parasitas <i>versus</i> gradiente de desempenho	28
Parasitas <i>versus</i> gradiente de aptidão	35
Conclusões	37

Bibliografia	39
---------------------------	----

Figuras e Tabelas

Figura 1. <i>Rhinella icterica</i> (Anura: Bufonidae), espécie utilizada no presente estudo.	50
Figura 2. Pista circular utilizada nos testes de desempenho locomotor de <i>Rhinella icterica</i>	50
Figura 3. Esfregaços sanguíneos com diferentes tipos de leucócitos de <i>Rhinella icterica</i> .	51
Figura 4. Relações entre carga parasitária e variáveis fisiológicas de <i>Rhinella icterica</i>	52
Tabela 1. Análise descritiva da carga parasitária e das variáveis ambientais, comportamentais, fisiológicas e morfológicas de <i>Rhinella icterica</i>	53
Tabela 2. Correlações entre variáveis ambientais, temperatura corpórea e esforço vocal de <i>Rhinella icterica</i>	54
Tabela 3. Equações de regressões para diferentes variáveis de <i>Rhinella icterica</i>	55
Tabela 4. Prevalência, intensidade média e abundância média de helmintos em diferentes órgãos de <i>Rhinella icterica</i>	56

Tabela 5. Componentes principais gerados a partir das variáveis morfológicas de <i>Rhinella icterica</i>	57
Tabela 6. Componentes principais gerados a partir das variáveis sanguíneas de <i>Rhinella icterica</i>	57
Tabela 7. Correlações entre carga parasitária (total e nos órgãos) com variáveis comportamentais, fisiológicas e morfológicas de <i>Rhinella icterica</i>	58
Anexo 1. Morfologias e morfometrias usadas na identificação dos parasitas encontrados em <i>Rhinella icterica</i>	60
Anexo 2. Exemplos de estruturas morfológicas usadas na identificação das espécies do grupo Nematoda e Acanthocephala encontradas em <i>Rhinella icterica</i>	61
Anexo 3. Certificado do comitê de ética do projeto: “Correlações comportamentais, fisiológicas e morfológicas da carga parasitária em <i>Rhinella icterica</i> (Anura: Bufonidae)	65

Resumo: Como parte das variáveis ambientais, os parasitas afetam a trajetória ontogenética e influenciam a expressão de inúmeros caracteres fenotípicos que afetam a aptidão (*fitness*) de seus hospedeiros. Deste modo, compreender como os parasitas se relacionam com diferentes aspectos da organização hierárquica do fenótipo é determinante para estabelecer a importância dos parasitas como agente seletivo dos hospedeiros. Dentro do gradiente de desempenho, o desempenho locomotor pode fornecer, de forma integrativa, um sistema propício para o estudo das consequências da carga parasitária sobre as condições físicas dos hospedeiros. A presença de parasitas alojados nos órgãos de seus hospedeiros, juntamente com ativação do sistema imune, pode impor a estes um déficit nutricional, tanto de energia quanto de materiais, afetando seu desempenho locomotor. Dentro do gradiente de aptidão, os efeitos parasitários no comportamento dos hospedeiros comprometem seu nível de atividade, sobrevivência e estratégias nas disputas intra/intersexuais, incluindo *displays* que podem ser informativos quanto à qualidade genética dos machos. Por possuir comportamento reprodutivo observável em campo e ser de fácil manipulação em laboratório, *Rhinella icterica* torna-se um bom modelo para estudar as relações entre parasitas e a organização hierárquica do fenótipo. A partir do que foi exposto, o objetivo do presente estudo foi compreender como a carga parasitária encontra-se associada a variações de características comportamentais, fisiológicas e morfológicas em *Rhinella icterica*. Dentre as variáveis medidas encontram-se: Esforço vocal em campo, taxa metabólica em repouso, desempenho locomotor, carga parasitária, massa dos órgãos internos (baço, coração, intestino, rim e fígado) e perfil leucocitário. Machos adultos de *R. icterica* encontrados na natureza são infectados por helmintos de diferentes grupos taxonômicos. Adicionalmente, indivíduos de *R. icterica* com maiores cargas parasitárias (total, pulmonar e/ou do trato gastro-intestinal) apresentaram aumento da massa do intestino, rins e ventrículo; aumento da relação neutrófilos:linfócitos; queda da taxa metabólica de repouso; queda do desempenho locomotor. Este estudo conclui que a carga parasitária está relacionada a diversos aspectos da organização hierárquica do fenótipo, incluindo tanto aspectos fisiológicos e morfológicos associados ao custo energético de manutenção quanto ao desempenho locomotor. Ao menos um dos componentes associados à seleção sexual, o esforço vocal, não guarda relação com a carga parasitária nesta espécie.

Abstract: As part of the environmental variables, the parasites affect the ontogenetic trajectory and influence the expression of many phenotypic characters that affect host fitness. Thus, understanding how the parasites are related to different aspects of the hierarchical phenotype organization is necessary to establish the importance of parasites as selective agents to their hosts. Within the gradient of performance, locomotor performance can provide a suitable system to study the consequences of parasite load on the physical conditions of the hosts. The presence of parasites lodged in the bodies of their hosts, along with activation of the immune system, can impose a nutritional deficit, both of energy and materials, affecting the locomotor performance of the host. Within the gradient of fitness, parasites affect behavior of the hosts, compromising their level of activity, survival, and strategies in intra/intersexual disputes, including displays that can be informative of male genetic quality. Given that *Rhinella icterica* shows reproductive behavior easy to be observed in the field, and is also easily manipulated in the laboratory, this species is a good model to study the parasitic relationships with the hierarchical organization of the phenotype. The goal of this study was to understand how the parasite load is linked to variations in *Rhinella icterica* behavior, physiology and morphology. Among the variables measured are: vocal effort in the field, resting metabolic rate, locomotor performance, parasite load, internal organs mass (spleen, heart, intestine, kidney and liver), and blood leukocytes. Adult males of *R. icterica* found in nature are infected with helminths from different taxonomic groups. Additionally, individuals of *R. icterica* with higher parasitic loads (total, lung and / or gastro-intestinal) showed increased intestinal, kidney, and heart masses; increased neutrophils:lymphocytes ratio, decreased resting metabolic rate, and decreased locomotor performance. This study concludes that parasite load is related to several aspects of the hierarchical organization of the phenotype, including both morphological and physiological aspects associated with the cost of maintenance and locomotor performance. At least one of the components associated with sexual selection, vocal effort, is not related to the parasite load in this species.

Efeitos parasitários nas características que compõem a organização hierárquica do fenótipo do hospedeiro

O fenótipo de um indivíduo é resultante da interação entre o seu genótipo e o ambiente a que este indivíduo é exposto ao longo de sua história de vida. A variação na interação entre genótipos e os diversos fatores ambientais ao longo da trajetória da vida dos indivíduos gera a variabilidade fenotípica, e a ação da seleção natural sobre esta, produz as suas diferenças em aptidão. Adicionalmente, a expressão fenotípica resulta da complexidade dos fatores individuais, seus arranjos dentro de hierarquias e de suas interações (Arnold 1983; Garland Jr and Carter 1994; Ricklefs and Wikelski 2002; Willmore et al. 2007).

Como parte das variáveis ambientais, os parasitas afetam a trajetória ontogenética e influenciam a expressão de inúmeros caracteres fenotípicos de seus hospedeiros como estratégia para sua sobrevivência e transmissão (Thomas et al. 2010). A forma e o grau desses efeitos são determinados pelos caracteres relacionados à virulência, resistência e tolerância, e de como esses caracteres afetam a aptidão do hospedeiro (Carval and Ferriere 2010; Schulte et al. 2010). Esses efeitos podem ocorrer desde a vida embrionária até a morte do hospedeiro (Schall et al. 1982; Hamilton and Zuk 1982; Tinsley 1990; Folstad and Karter 1992; Goater 1994; Zuk and McKean 1996; Johnson et al. 1999; Clobert et al. 2000; Gandon et al. 2002; Kristan 2002; Moore and Wilson 2002; Brown et al. 2006; Medoc and Beisel 2008; Stjernman et al. 2008).

O desenvolvimento de constante ação e reação entre hospedeiro e parasita ao longo do estabelecimento da associação entre estes resulta em alterações na fisiologia e morfologia do hospedeiro (Johnson et al. 1999; Roberts et al. 1999; Tinsley et al. 2002; Kristan and Hammond 2004; Dingemanse et al. 2009). Adicionalmente, diversos estudos têm demonstrado que esta reorganização fenotípica do hospedeiro pode

envolver também diversos aspectos de seu comportamento, alterando a forma como o complexo hospedeiro-parasita interage com o ambiente (Schall et al. 1982; Thompson 1990; Moller 2008; Kolluru et al. 2009). Tais alterações refletem respostas ao estresse associado ao parasitismo, de forma a trazer as condições funcionais do hospedeiro para valores o mais próximo possível da condição de homeostase (Thompson 1990; Kristan 2002a; Kristan and Hammond 2003; Kristan and Hammond 2004). O acúmulo de evidências de efeitos diretos e indiretos da infecção sugere fortemente que a carga parasitária deve ser um importante determinante do valor adaptativo (*fitness*) do hospedeiro (Holmes and Zoar 1990; Goater 1993; Clobert et al. 2000; Moore and Wilson 2002; Zhong and Yan 2005; Kolluru et al, 2009). Deste modo, a compreensão de quais são as características fenotípicas do hospedeiro afetadas pelos parasitas, bem como suas conseqüências sobre a aptidão, é determinante para estabelecer a importância do parasita como agente seletivo dos indivíduos hospedeiros. Para tanto, é necessário compreender como os parasitas se relacionam com diferentes aspectos da organização hierárquica do fenótipo.

No paradigma da organização hierárquica do fenótipo, proposto por Arnold (1983) e complementado por Garland & Carter (1994), a expressão dos caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (massa corpórea e de seus órgãos constituintes, densidade mitocondrial e atividade de enzimas nas mais diversas vias metabólicas nos diferentes órgãos, quantidade de hemáceas e leucócitos na corrente sanguínea, por exemplo), bem como suas inter-relações, dependem da interação entre o genótipo e o meio ambiente em que o indivíduo se encontra, e são responsáveis por caracterizar os diferentes aspectos da habilidade de desempenho do organismo (eficiência digestória, metabólica e da defesa imunitária, taxas de crescimento, desempenho locomotor aeróbio e anaeróbio, por exemplo). O desempenho, por sua vez,

limita as opções comportamentais do organismo em seu ambiente. O comportamento do indivíduo é responsável, por sua vez, pela sua sobrevivência (sucesso nas disputas por obtenção de recursos energéticos, uso de diferentes padrões de defesa anti-predatórias, por exemplo) e reprodução (sucesso nas disputas intra e/ou intersexual na obtenção de acasalamentos), afetando sua aptidão. A partir desse pressuposto, a organização hierárquica do fenótipo pode ser dividida em um gradiente de desempenho (influência dos caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos no desempenho do indivíduo) e um gradiente de aptidão (influência do desempenho no comportamento e aptidão do indivíduo) e, a partir desta divisão, mostrar a atuação da seleção natural sobre os indivíduos e os padrões de co-evolução entre os diferentes aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais que integram o fenótipo (Arnold 1983; Garland and Carter 1994; Wikelski and Romero 2003).

Exemplos de efeitos parasitários no gradiente de desempenho

O desempenho locomotor tem sido freqüentemente investigado dentro do contexto da fisiologia ecológica e comparativa por uma série de razões conceituais e de ordem prática. Primeiro, a locomoção é um componente fundamental para a maior parte dos comportamentos, estando intrinsecamente associada à defesa territorial, forrageamento, escape de predadores, interações de corte, migração, entre outros; freqüentemente refletindo aspectos da ecologia comportamental das espécies, populações e até mesmo sexos dentro de uma espécie. Adicionalmente, o desempenho representa, dentro da organização hierárquica do fenótipo, o ponto de maior probabilidade de atuação da seleção natural. Ao mesmo tempo, o desempenho locomotor reflete as interações de múltiplos aspectos da fisiologia e morfologia subjacentes, permitindo identificar estruturas e funções que impõem limitações

intrínsecas ao desempenho. Finalmente, a locomoção pode ser facilmente estimulada em laboratório, permitindo medidas em diferentes graus de intensidade e duração (Arnold 1983; Bennett and Huey 1990; Bennet 1991; Clobert et al. 2000; Irschick and Garland, 2001). Desta forma, a medida do desempenho locomotor pode fornecer, de forma integrativa, um sistema propício para o estudo das conseqüências da carga parasitária sobre as condições físicas dos hospedeiros.

Numerosos estudos comparativos têm demonstrado que a locomoção pode apresentar uma alta demanda energética e, em muitas espécies, as mais altas taxas metabólicas são alcançadas durante a atividade locomotora de alta intensidade (e.g., Taylor et al. 1982; Taigen 1983; Hinds et al. 1993). Sabe-se também que a variação intra e interespecífica em desempenho locomotor aerobiamente sustentado encontra-se intimamente associada à função de diversos mecanismos subjacentes, associados tanto à disponibilização de nutrientes quanto de oxigênio para a musculatura em exercício (Hoppeler and Weibel 1998). A presença de parasitas alojados nos órgãos de seus hospedeiros, principalmente no trato digestório e nos sistemas pulmonar e circulatório, pode impor a estes um déficit nutricional, tanto de energia quanto de materiais, afetando seu desempenho locomotor. (Schall et al. 1982; Holmes and Zohar 1990; Kristan and Hammond 2003).

Em um trabalho de captura e recaptura, juntamente com os resultados de um trabalho experimental, Kelehear e colaboradores (2009; 2010) demonstraram que a queda do desempenho locomotor de *Bufo marinus*¹ está associada a uma limitação energética relacionada ao efeito do *Rhabdias pseudosphaerocephala* (Nematoda pulmonar) na taxa de crescimento, diminuindo a viabilidade de indivíduos recém-metamorfoseados e adultos de *Rhinella marina*. Esses estudos de Kelehear e

¹ A nomenclatura *Bufo marinus* será substituída por *Rhinella marina* no restante do texto, de acordo com Pramuk et al. (2008).

colaboradores (2009; 2010) confirmam estudos anteriores de Goater and Ward (1992) e Goater e colaboradores (1993) que mostraram, experimentalmente, os efeitos do *Rhabdias bufonis* (Nematoda pulmonar) na redução de captura de presas (anorexia), taxa de crescimento e sobrevivência, impactando indiretamente a capacidade locomotora de *Bufo bufo*. Em outro estudo, desta vez com lagartos *Lacerta vivípara*, indivíduos recém-nascidos com menor taxa de crescimento e de desempenho locomotor apresentaram maiores carga de protozoários sanguíneos (Clobert et al. 2000).

Muitas infecções protozoárias e helmínticas causam anorexia do hospedeiro, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a menor taxa de crescimento e a limitação energética no desempenho nos indivíduos infectados (Goater and Ward 1992; Coop and Holmes 1996; Kelehear 2009). Simultaneamente à anorexia, as infecções parasitárias podem causar queda da eficiência na assimilação de nutrientes, tanto através da competição direta por produtos da digestão, quanto por estimular respostas de reparo tecidual aos danos diretamente causados pelos parasitas (Holmes and Zohar 1990). Kristan (2002), por exemplo, relatou que camundongos (*Mus musculus*) experimentalmente infectados com um nematódeo intestinal (*Heligmosomoides polygyrus*) apresentaram aumento na massa da mucosa do intestino delgado, sugerindo uma resposta compensatória à competição por nutrientes por parte dos parasitas intestinais. Estudos realizados com porquinhos-da-índia e ovelhas infectados com o nematódeo intestinal *Trichostrongylus colubriformis* registraram, em resposta à perda de proteína plasmática dentro do intestino, um aumento de síntese protéica no fígado e uma grande depressão de síntese de proteína muscular (Thompson 1990).

Esse aumento na degradação da musculatura esquelética e da síntese protéica no fígado pode ser ainda uma consequência da resposta do sistema imune à infecção na sua fase aguda. A resposta imune causa uma resposta proteolítica no músculo esquelético

mediado pelos níveis de glicocorticóides e citocianinas inflamatórias, levando a um desequilíbrio negativo de nitrogênio no hospedeiro e a um custo energético adicional ao hospedeiro devido à acelerada quebra de proteínas que pode levar a uma redução da massa corpórea (Hasselgren and Fischer 1998; Lochmiller and Deerenberg 2000). De acordo com Lochmiller and Deerenberg (2000) as células do sistema imune consomem glicose e glutaminas em altas taxas, levando a uma rápida queda nas reservas energéticas e ao aumento da gliconeogênese no hospedeiro, e provocando severas reduções de tecido magro caso a infecção se torne crônica. Esse processo catabólico pode elevar o custo de manutenção dos animais, observado pelo aumento na taxa de consumo de oxigênio do hospedeiro logo após o início do desencadeamento da resposta imune às infecções parasitárias (Lochmiller and Deerenberg 2000). Em situações particularmente desfavoráveis, uma combinação de alta demanda energética (termogênese, por exemplo) e baixa disponibilidade de recursos no ambiente (durante o inverno, por exemplo), esse aumento no custo de manutenção associado à infecção parasitária pode aumentar as restrições à sobrevivência e reprodução do hospedeiro (Kristan and Hammond 2003; Ricklefs and Wikelski 2002). Em mamíferos, por exemplo, camundongos de laboratório (*Mus musculus*) experimentalmente infectados por Nematoda intestinal (*Heligmosomoides polygyrus*), apesar de apresentar mesma massa corpórea que o grupo experimental, apresentaram uma menor reserva lipídica, diminuíram a capacidade intestinal de absorção de glicose e tiveram um aumento na taxa metabólica de repouso. Quando outro grupo dos mesmos camundongos infectados foi, simultaneamente, exposto ao frio os indivíduos apresentaram menores reservas energéticas e um aumento do custo de manutenção (Kristan and Hammond 2000).

Por outro lado, a resposta metabólica à infecção parasitária pode ser diferenciada em vertebrados ectotérmicos. Schall e colaboradores (1982) encontraram um aumento

na taxa máxima de consumo de oxigênio em lagartos *Sceloporus occidentalis* infectados com *Plasmodium mexicanum*, mas nenhuma alteração nas taxas metabólicas de repouso. Recentemente, Scholnick e colaboradores (2010) mostraram que *Sceloporus occidentalis* infectados com *Plasmodium mexicanum* apresentaram um aumento de 30% no consumo de oxigênio quando comparados a lagartos não infectados durante a recuperação após atividade locomotora. Já Moretti e colaboradores (enviado para publicação) encontraram uma correlação negativa entre carga parasitária total e desempenho locomotor de sapos (*Rhinella icterica*) coletados na natureza, mas nenhuma relação com a taxa de consumo de oxigênio foi observada. Todos esses trabalhos mostram que, muitas vezes, os efeitos dos parasitas no desempenho do hospedeiro são particularmente importantes durante períodos de alta atividade aeróbia do hospedeiro, permanecendo inconspícua durante condições de baixa demanda energética (Holmes and Zohar 1990; Goater et al. 1993).

Os estudos acima expostos mostram relações entre parasitas e o gradiente de desempenho dos organismos, evidenciando a importância da presença de parasitas como fator modelador de estruturas e mecanismos subjacentes ao desempenho e custo de manutenção dos hospedeiros, mesmo que sua ação seja de forma indireta. Entretanto, diversos outros estudos têm investigado a importância da presença de parasitas na determinação do comportamento do hospedeiro e, conseqüentemente, em seu valor adaptativo.

Efeitos parasitários no gradiente de aptidão

Os parasitas, juntamente com os efeitos no gradiente de desempenho, podem afetar caracteres relacionados ao comportamento dos hospedeiros que é fundamental para os caracteres de forrageamento como, por exemplo, busca de alimentos, defesa

anti-predatória e comportamento reprodutivo (Barnard and Behnke 1990). Essas alterações comportamentais estão relacionadas, geralmente, aos danos parasitários nos órgãos infectados, comprometendo o funcionamento normal do órgão. Outro fator são as alterações nos níveis nutricionais do hospedeiro, tanto de energia como de materiais, pela competição e queda da eficiência de assimilação de nutrientes e anorexia. Outra possibilidade são as modulações parasitárias nos sistemas neuroendócrinos do hospedeiro que ocorrem, principalmente, nas relações entre parasitas e hospedeiros intermediários (Holmes and Zoar 1990; Thomas et al. 2010).

Estudos com peixes e répteis tem mostrado como infecções parasitárias alteram os níveis de atividades do hospedeiro e como isso se relaciona com a busca de alimentos e a defesa anti-predatória. Holmes and Zoar (1990) mostraram que metacercárias (*Diplostomum spathaceum*) alojadas na retina podem prejudicar a acuidade visual de peixes, aumentando o tempo por busca de alimentos, levando à uma redução na eficiência alimentar e aumentando o risco dos indivíduos serem predados, tanto pelo aumento do tempo gasto forrageando quanto pela redução da resposta de fuga. Clobert e colaboradores (2000) mostraram que lagartos (*Lacerta vivipara*) com menor resistência locomotora pós-nascimento tendiam a ter um nível de atividade voluntária reduzida, menor taxa de crescimento e maior carga de protozoários sanguíneos, contudo, esses indivíduos mais infectados tiveram menor risco de predação, acessado através das caudas inteiras. Inversamente, indivíduos com maior resistência locomotora pós-nascimento tiveram maior nível de atividade, maior taxa de crescimento e baixa carga parasitária, mas maiores incidências de caudas quebradas. Apesar de não medirem a taxa de tomada de alimento, esses autores sugerem que os indivíduos usam estratégias diferentes que podem resultar no final em aptidão semelhante entre os indivíduos infectados e não infectados.

Outros estudos, porém, mostram como as infecções parasitárias podem estar relacionadas ao comportamento reprodutivo dos hospedeiros e como essa relação está associada ao sucesso nas disputas intrasexual e intersexual por acasalamentos. Kolluru e colaboradores (2008) estudaram os efeitos da dieta e infecção por *Gyrodactylus turnbulli* (Trematoda) no comportamento reprodutivo de peixes (*Poecilia reticulata*), através de competição e dominância entre os machos. Machos infectados gastaram mais tempo forrageando e menos tempo cortejando e competindo intrasexualmente que machos não infectados, sugerindo que machos infectados são energeticamente mais limitados. Em contrapartida, os machos não parasitados venceram mais disputas intrasexuais, cortejaram as fêmeas mais frequentemente e receberam respostas positivas das fêmeas ao cortejo mais frequentemente que machos infectados. Por outro lado, em espécies com dimorfismo sexual em mamíferos (sendo os machos, geralmente, maiores que as fêmeas), o sucesso reprodutivo está relacionado com a habilidade competitiva dos machos que resultaram na evolução de tamanho corpóreo grande e de armamentos (chifres, cornos, por exemplo), em contrapartida, há uma relação entre o desenvolvimento desses caracteres e mortalidade nos machos, sendo o parasitismo a principal causa desta mortalidade (Moore and Wilson 2002).

A evolução por seleção sexual está relacionada a um conflito que envolve a expressão dos caracteres sexuais secundários, já que estes aumentam o sucesso reprodutivo, mas ao mesmo tempo parecem diminuir a chances de sobrevivência dos indivíduos. Contudo, esse conflito mostra a habilidade e qualidade dos indivíduos que conseguem sobreviver e se reproduzir mesmo apresentando caracteres que parecem diminuir suas chances de sobrevivência (Zahavi 1975; 1977). Para Hamilton and Zuk (1982) essa qualidade dos indivíduos indicada, principalmente, pelos ornamentos mais desenvolvidos, está associada a genes relacionados à resistência a vários patógenos e

parasitas. Desta maneira, indivíduos de alta qualidade conseguem alocar mais recursos energéticos no desenvolvimento de caracteres sexuais secundários exacerbados. Complementando essa hipótese, Fostad and Karter (1992), propuseram que a testosterona é responsável por modular essa qualidade. Segundo esses autores, embora altas concentrações plasmáticas de testosterona confirmem o benefício de desenvolver características sexuais secundárias exageradas, aumentando potencialmente o sucesso reprodutivo do indivíduo, este hormônio apresenta um efeito imunossupressor. A imunossupressão testosterona-dependente representaria um alto custo para o indivíduo e, desta forma, a sinalização de viabilidade difundida pelo caractere sexual se enquadraria nos critérios de indicador honesto (Zahavi 1977). Sendo assim, os perfis de testosterona e/ou responsividade a esta e, conseqüentemente, seus efeitos - imunossupressão e expressão das características sexuais dos machos - devem ser autorregulados em resposta à carga parasitária. Deve-se levar em conta, pela hipótese do *obstáculo imunocompetente*, que a eficiência da regulação parasita-dependente apresentaria um componente genético.

Essas relações entre parasitismo e componentes do gradiente de aptidão reforçam a importância destes organismos como fator seletivo para os hospedeiros e sua importância na evolução de caracteres sexuais secundários.

***Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae) como modelo para estudar as relações entre parasitas e organização hierárquica do fenótipo do hospedeiro**

A maioria dos estudos que analisam a influência dos fatores bióticos e abióticos na organização hierárquica do fenótipo concentra os trabalhos no gradiente de desempenho e na influência deste no comportamento, já que mensurar a aptidão dos indivíduos a longo prazo, principalmente na natureza é custoso (Wikelski and Romero

2003). Em contraste, caracteres do gradiente de desempenho e comportamento de alguns animais podem ser mensurados em campo e em laboratório e capazes de produzir resultados valiosos sobre aptidão dos indivíduos, mesmo que de forma indireta (Arnold 1983; Wikelski and Romero 2003). Por esses motivos, é importante estudar como variáveis bióticas e abióticas afetam caracteres que representam, de uma forma geral, as dinâmicas de cada gradiente fenotípico. Para tanto, *Rhinella icterica*, uma espécie da família Bufonidae, torna-se um modelo interessante, pois, é fácil de manipulá-lo em laboratório para medir caracteres morfológicos (massa corpórea e comprimento rostro-cloacal, por exemplo) e fisiológicos (taxa metabólica de repouso e desempenho locomotor, por exemplo), ambos relacionados ao gradiente de desempenho. Adicionalmente, é possível medir aspectos do comportamento reprodutivo em campo, tais como a taxa de vocalização, que está relacionado ao gradiente de aptidão. Assim sendo, *R. icterica* representa um importante sistema para o estudo do impacto da carga parasitária sobre diversos aspectos da biologia de uma espécie de vertebrado em vida livre.

Adicionalmente, diversos estudos integrativos realizados com anfíbios anuros têm demonstrado a importância de diversos aspectos morfológicos e fisiológicos para a determinação do desempenho locomotor, sendo este, por sua vez, correlacionado com aspectos comportamentais (Pough et al. 1992; James et al. 2006). Alguns grupos filogenéticos são particularmente caracterizados por altas taxas de consumo de oxigênio durante a atividade locomotora, como por exemplo, na atividade de forrageamento relacionado à busca ativa de alimentos no ambiente, interações sociais e dispersão (Pough et al. 1992). Dentre estes, destacam-se os Dendrobatídeos e os Bufonídeos, representando modelos interessantes para um estudo sobre o efeito da carga parasitária sobre o balanço energético e o desempenho locomotor aerobiamente sustentado. Esse

efeito da carga parasitária deve refletir-se em níveis de organização superiores, tais como o forrageamento em campo e reprodução com um forte impacto sobre o valor adaptativo.

A manutenção da atividade vocal em anuros representa, também, uma alta demanda aeróbia (Pough et al. 1992; Bevier 1995; Ressel 1996) e devido ao conspícuo comportamento vocal dos machos de anuros, este grupo têm se mostrado particularmente interessante para testes de premissas associadas à seleção sexual (Hausfater 1990; Sullivan 1991; Pfennig and Tinsley 2002; Sullivan and Kwiatkowski 2007; Castellano 2009). Para a maior parte das espécies de anuros, caracteres associados ao tamanho e propriedades das vocalizações são importantes nos processos de seleção intrasexual e intersexual. Fêmeas de diversos grupos de anuros preferem, de uma forma geral, características comportamentais energeticamente exigentes, como a manutenção de altas taxa de vocalização, e que expõe os machos a um maior risco de predação (custo direto) e/ou redução do crescimento (custo indireto), mas que, provavelmente, aumentam o sucesso reprodutivo dos machos (Hinshaw and Sullivan 1990; Andersson 1994; Wells 2001; Sullivan and Kwiatkowski 2007).

Em anfíbios, a motivação de vocalizar está associada ao ambiente social em que os indivíduos se encontram (Wells 1988; Penna et al. 2005). Segundo Wells (1977), machos de espécies com períodos reprodutivos curtos variam de estratégia dependendo da densidade de machos no sítio reprodutivo. Quando a densidade de coro é alta, machos procuram ativamente por fêmeas e interações agressivas entre os machos tornam-se comuns. Neste caso, fatores relacionados ao desempenho locomotor podem ser mais importantes no sucesso reprodutivo. Contudo, quando a densidade de coro é baixa ficam vocalizando em lugares fixos na tentativa de atrair as fêmeas. Neste caso, fatores relacionados as propriedades da vocalização podem ser mais importantes no

sucesso reprodutivo. Em densidades intermediárias, os machos adotam uma estratégia incorporando elementos de atração por vocalização e procura ativa (Wells 1977). Além disso, o desenvolvimento das bases controladoras e efectoras do comportamento vocal, bem como sua ativação na época reprodutiva, é mediado por hormônios esteróides, como a testosterona (Wilczynski and Chu 2001) e a corticosterona, que está relacionada à mobilização energética necessária para a sustentação desta atividade (Emerson 2001). Tanto os andrógenos quanto os hormônios inter-renais podem apresentar efeitos imunossupressores, aumentando a probabilidade de infecções parasitárias (Wingfield 1994).

Na região de Botucatu (SP), *R. icterica* é reprodutivamente ativo durante o inverno, com estação reprodutiva, relativamente curta, se estendendo de julho a setembro e um pico de atividade em agosto (Jim 2002). Observações pessoais revelaram que os indivíduos machos desta espécie variam seu comportamento de acordo com Wells (1977), mostrando-se um excelente modelo para verificar os efeitos parasitários em aspectos relacionados ao gradiente de desempenho (desempenho locomotor, por exemplo) e ao gradiente de aptidão (comportamento vocal, por exemplo), fundamentais no sucesso reprodutivo dos indivíduos de *R. icterica*. A presença dos parasitas deve também alterar diversos aspectos morfológicos e funcionais em níveis de organização inferiores, subjacentes ao desempenho e à aptidão. A investigação de variáveis morfo-funcionais tais como a taxa de consumo de oxigênio, a massa de diferentes órgãos e o perfil leucocitário, deve permitir um maior entendimento tanto dos possíveis fatores limitantes do desempenho aeróbio, comportamento vocal e da manutenção da homeostase energética, quanto dos mecanismos compensatórios do efeito deletério causado pelos parasitas.

Objetivos

Considerando todos os aspectos acima citados, o objetivo central do presente projeto de Mestrado, foi compreender como a carga parasitária encontra-se associada a variações de características comportamentais, morfológicas e fisiológicas em *Rhinella icterica*. Dentre as variáveis medidas encontram-se: 1. Esforço vocal em campo. 2. Temperatura de atividade dos animais em campo. 3. Taxa metabólica em repouso. 4. Desempenho locomotor. 5. Carga parasitária. 6. Massa dos órgãos internos (coração, fígado, rins, intestino e baço). 8. Perfil leucocitário.

De maneira específica, foram testadas as hipóteses de que os indivíduos de *R. icterica* com maior carga parasitária devem ter:

- Menor esforço vocal, desempenho locomotor e índice de condição corpórea;
- Maior taxa metabólica de repouso;
- Maior massa relativa de órgãos como coração, intestino, rins, fígado e baço;
- Maior relação neutrófilo:linfócito e maior concentração de eosinófilos na circulação sanguínea.

Materiais e Métodos

Sítio de estudo e espécie incluída

Rhinella icterica (Anura: Bufonidae), a espécie utilizada no presente estudo, encontra-se distribuída por toda região sul-sudeste de Mata Atlântica do Brasil (desde o Rio Grande do Sul até o sul do Espírito Santo), do sul a leste do Paraguai e a província de Misiones na Argentina (Stevaux 2002; Pramuk et al. 2008). Na região de Botucatu, onde os animais foram coletados, *R. icterica* é reprodutivamente ativo durante o inverno, com estação reprodutiva se estendendo de julho a setembro e um pico de atividade em agosto (Jim 2002). Como a maior parte dos caracteres medidos poderia apresentar variação sazonal, ontogenética e sexual, as medidas foram restritas a machos, primariamente durante o pico da temporada reprodutiva. Foram coletados 28 indivíduos da espécie *Rhinella icterica* (Figura 1). Os indivíduos foram coletados em 4 localidades distintas do Município de Botucatu (Viveiro de mudas Sacae: 22°59'25.5''S; 48°30'13.6''W, Associação dos Docentes da Unesp: 22°53'25.04''S; 48°29'24.33''W, Jardim Botânico do Instituto de Biociências: 22°53'12.34''S; 48°30'00.8''W e lago da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: 22°53'00.8''S; 48°30'02.9''W). Vinte e dois indivíduos foram coletados entre os dias 22 de julho e 28 de setembro de 2009 e os outros 6 entre os dias 14 de julho e 21 de julho de 2010. Para todos os indivíduos foram coletados dados ambientais de campo, esforço vocal em campo, perfil leucocitário e parasitas. Além desses dados, para os primeiros vinte e dois indivíduos, foram coletados dados da taxa metabólica de repouso, desempenho locomotor e massas secas de órgãos.

Os animais foram coletados sob a licença de captura e transporte do IBAMA (processo número 02010.003380/04-82). A metodologia para obtenção dos dados descrita nos itens a seguir foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (número protocolo 169-CEEA).

Dados de campo

Os indivíduos foram localizados por inspeção visual e foram submetidos à observação focal durante 30 minutos para quantificação do comportamento vocal. Foram utilizadas lâmpadas vermelhas e o início dos registros comportamentais se deu 10 minutos após o indivíduo ter sido localizado, para minimizar a interferência do observador sobre o comportamento apresentado pelos animais. Todas as observações foram exclusivamente noturnas. Para cada indivíduo, o número total de vocalizações foi contado para obtenção do esforço vocal, calculado a partir do número de vocalizações em 30 minutos multiplicado pela duração média. Após o término de cada observação, a temperatura corpórea superficial foi medida com um termômetro infravermelho (TI-900, Instrutherm). Os indivíduos foram então capturados e transportados ao laboratório em recipientes plásticos individuais, para posterior coleta adicional de dados.

Dados de temperatura e umidade do ambiente foram coletados através do uso de carregadores de dados (Hobo) (Navas and Araujo 2000; Gomes 2002). Os carregadores de dados de temperatura e umidade foram colocados nos micro-habitats utilizados para vocalização, e programados para registrarem dados a cada 5 min.

Manutenção dos anuros em laboratório

Os animais foram mantidos em recipientes plásticos individuais com plantas plásticas, substrato úmido e algum objeto para fornecer abrigo. As tampas dos recipientes tinham uma tela para permitir circulação do ar. Os animais foram expostos ao ciclo natural de luz e temperaturas compatíveis com seu regime térmico natural. Os recipientes foram diariamente inspecionados, para retirada de fezes, impedindo a autoinfestação. Todas as medidas em laboratório foram realizadas entre 14 e 30 dias da chegada ao laboratório.

Taxa metabólica em repouso

As taxas metabólicas de repouso foram estimadas através de medidas de taxa de consumo de oxigênio. Anuros 100% hidratados foram colocados individualmente em câmaras metabólicas (750 mL) por 2 horas no interior de uma câmara climática (Germinator 102FC – Eletrolab Ltda.) à temperatura experimental (25 °C) antes de qualquer medida. Este período de aclimação deve ser suficiente para que os animais se recuperem de qualquer estresse de manipulação, assumam uma postura de repouso e equilibrem sua temperatura corpórea com a experimental (Gomes et al. 2004). Durante o período de aclimação, ar a 100 mL.min⁻¹ foi bombeado através das câmaras usando um fluxímetro acoplado à bomba (Flowbar Multichannel – 8 pump system - Sable Systems; Henderson, NV, USA), para evitar ocorrência de hipóxia e/ou hipercapnia. Durante as medidas, um chumaço de algodão umedecido foi colocado no interior das câmaras metabólicas para auxiliar a manutenção do balanço hídrico. Um sistema de controle do fluxo de ar com canais múltiplos (Multiplexer V3 - Sable Systems; Henderson, NV, USA) foi usado para direcionar, sequencialmente, ar das câmaras metabólicas, no mesmo fluxo, para um analisador de oxigênio (FC-10a O₂ analyzer - Sable Systems; Henderson, NV, USA). Antes de passar pelo analisador de oxigênio, as amostras de ar vindas das câmaras passaram por um filtro contendo drierite/ascarite/drierite, para remover o vapor de água e o gás carbônico. Dados do analisador de oxigênio foram registrados em um computador equipado com o software EXPEDATA 1.1.15 (Sable Systems; Henderson, NV, USA), através de uma interface UI2 (Sable Systems; Henderson, NV, USA). A taxa de consumo de oxigênio ($\dot{V}_{O_2\text{std}}$) foi calculada como:

$$\dot{V}_{O_2\text{std}} = \dot{V}_i * (FEO_2 - FSO_2) / (1 - FSO_2),$$

onde $\dot{V}_a$ é o fluxo de ar ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ CNTP; Condições Normais de Temperatura e Pressão) e $F\text{EO}_2$ e $F\text{SO}_2$ são as concentrações fracionais de O_2 no ar seco, de entrada e saída da câmara, respectivamente. As câmaras metabólicas foram filmadas para monitorar movimentos, e as medidas foram repetidas até a obtenção de 20 minutos de registro de contínuo repouso de cada animal. Antes e depois de cada registro contínuo dos animais, foi registrada uma linha base de 10 minutos de ar livre de CO_2 e água, e o consumo de oxigênio foi calculado para as menores 4127 amostras contínuas (5 minutos). Imediatamente antes e depois de cada teste foi medida a massa corpórea (0,01g), e a média desses valores foi usada para expressar a taxa de consumo de oxigênio como $\text{mL O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Desempenho locomotor

O desempenho locomotor dos animais foi realizado no interior de uma câmara climática (FITOTRON – Modelo 011, Eletrolab), mantida a 25 °C e 75% U.R. Anteriormente às medidas, os animais foram individualmente mantidos por duas horas à temperatura do teste em recipientes plásticos com um substrato úmido, para prevenir perda de água corpórea. Os indivíduos tiveram suas bexigas urinárias esvaziadas, sendo em seguida secos com papel absorvente, pesados (0.01 g) e medidos em seu comprimento rostro-cloacal (0.01 cm). Os animais foram então estimulados a saltar em uma pista circular de madeira, com perímetro de 3,93 m (Figura 2). Durante um período de 10 minutos, os animais foram forçados a manter desempenho locomotor constante, empregando-se uma estimulação manual padronizada. A distância total percorrida durante esse período foi corrigida para o comprimento rostro-cloacal e expressa como unidades de comprimento rostro-cloacal.

Perfil leucocitário

No último dia de medidas, os indivíduos tiveram sua massa corpórea medida (0,01g) e uma seringa contendo EDTA 10% foi utilizada para retirar uma amostra de sangue (cerca de 100 μ L) através de punção cardíaca. Cerca de 10 μ L de sangue foram utilizados para a realização de esfregaços e, posteriormente, cada lâmina foi fixada em metanol e coradas segundo o protocolo do kit Hema 3. As determinações da proporção entre os diferentes tipos de glóbulos brancos foram analisadas e estabelecidas de acordo com Allender and Fry (2008) e Heatley and Johnson (2009) (Figura 3).

Massa dos órgãos

Depois das medidas de desempenho locomotor e da retirada da amostra de sangue, os animais foram anestesiados em uma solução de benzocaína (1g.L^{-1}) por 20 minutos (Fernandes et al. 2005) e mortos através de ruptura do cordão espinhal. Ventrículo, fígado, rins, intestino, baço, foram dissecados e suas massas úmidas foram pesadas (0,001g).

Finalmente, órgãos e carcaça foram mantidos por 8 dias em estufa de secagem (Biothec BT 316) mantida a 60°C, para a obtenção de massa seca. Um índice de condição corpórea dos indivíduos foi calculado a partir dos residuais da regressão da massa corpórea, como variável dependente, pelo comprimento rostro-cloacal, como variável independente (Jakob et al. 1996, Schulte-Hostedde et al. 2005).

Carga parasitária

Os endoparasitas encontrados foram retirados e contabilizados com o auxílio de uma lupa (ZEISS, Stemi DV4). Prevalência, intensidade média e abundância média de infecção para cada espécie foram calculados de acordo com Bush et al. (1997). Para

proceder à identificação das espécies, os Acanthocephala foram mantidos em água na temperatura de 4°C durante uma noite, e então fixados em uma solução fria de AFA (álcool-formalina-ácido acético), sendo posteriormente preservados em álcool 70%. Os Trematoda, depois de colocados em uma lâmina e pressionados com uma lamínula, foram fixados em uma solução fria de AFA. Os Nematoda foram fixados em uma solução quente de AFA (~70°C). Todas as espécies de helmintos estão preservadas em álcool 70%. Amostras das diferentes espécies foram processadas para identificação. Acanthocephala e Trematoda foram corados com carmine e clarificados com eugenol. Nematoda foram clarificados com fenol. Todas as amostras processadas foram analisadas com um sistema computadorizado (Leica Qwin Lite). As espécies de helmintos foram identificadas pela morfologia e morfometria (Anexos 1e 2) de acordo com Travassos et al. (1969), Vicente et al. (1990) e Smales (2007). Os espécimes encontrados serão depositados na Coleção Helmintológica do Instituto de Biociências de Botucatu (CHIBB).

Análise dos resultados

Todas as variáveis foram inicialmente submetidas à análise descritiva. Em seguida, as variáveis foram transformadas ($\log_{10}$) e a influência da massa corpórea sobre as demais variáveis foi estimada através do uso de regressão linear. Quando as análises de regressão demonstraram uma influência significativa da massa corpórea sobre qualquer variável, residuais da massa corpórea foram calculados para posterior inclusão nas análises posteriores. Foram realizadas duas análises de componentes principais com rotação *Varimax* com normalização *Kaiser* para os dois grupos de variáveis fenotípicas com maior número de variáveis medidas: as variáveis morfológicas com $N = 20$ (massa seca corpórea, do ventrículo, fígado, intestino e rins e o índice de condição corpórea) e

as variáveis associadas ao perfil leucocitário com $N = 28$ (quantidade relativa de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e basófilos e a relação entre neutrófilos e linfócitos). Componentes principais com eigenvalues > 1.00 foram considerados para as interpretações, incluindo as variáveis com valores de extração maiores que 0.70. Resultantes de cada componente extraído foram calculados através de regressões e salvos como variáveis compostas. Estas variáveis compostas, em conjunto com o esforço vocal, desempenho locomotor, taxa metabólica de repouso, quantidade relativa de monócitos e massa seca do baço, foram correlacionadas com as variáveis associadas à carga parasitária (Pearson). Foi realizada uma matriz de correlação, sendo que os dados de carga parasitária foram organizados por órgão infectado (parasitas totais, parasitas pulmonares e parasitas do trato gastrointestinal). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa *Statistica* (Statsoft, Tulsa, OK).

Resultados

Dados ambientais de campo

A análise descritiva para todas as variáveis estão presentes na Tabela 1. A temperatura da água manteve-se mais alta que a do ar de forma constante, e a temperatura corpórea dos indivíduos observados esteve correlacionada com as duas temperaturas ambientais (Tabela 2). O esforço vocal de *R. icterica* não guardou nenhuma relação com as variáveis ambientais (Tabela 2).

Análise descritiva e alometria

Todas as massas de órgãos escalaram positivamente com a massa corpórea ($0.45 < \beta < 1.16$, Tabela 3). Já a quantidade relativa de monócitos escalou negativamente com a massa corpórea ($\beta = -3.29$, Tabela 3).

Espécies, prevalência, intensidade média e abundância média de infecção parasitária em *Rhinella icterica*

As espécies de helmintos que infectaram os indivíduos de *R. icterica* foram *Acanthocephalus saopaulensis* (Acanthocephala), *Physaloptera* sp., *Oswaldocruzia subauricularis*, *Rhabdias* sp., espécie não identificada da família Cosmocercidae, *Falcaustra mascula* (Nematoda), *Mesocoelium monas* (Trematoda) e uma espécie de Trematoda não identificada. A espécie mais prevalente foi *Rhabdias* sp. e a mais abundante foi *Mesocoelium monas* (Tabela 4).

Análise de componentes principais e correlações entre carga parasitária com as variáveis comportamentais, fisiológicas e morfológicas

A análise de componentes principais das variáveis morfológicas resultou em três componentes (Tabela 5). O primeiro componente explicou 33.65% da variância e foi

relacionada com as massas do coração, intestino e rins. O segundo componente explicou 22.72% da variância e foi relacionada com a massa corpórea e o índice corpóreo. O terceiro componente explicou 17.30% da variância e foi relacionada com a massa do fígado. Já a análise de componentes principais das variáveis associadas ao perfil leucocitário resultou em dois componentes (Tabela 6), sendo que o primeiro componente explicou 52.98% da variância e foi relacionada com a quantidade relativa de neutrófilos e da relação entre neutrófilo: linfócito em um sentido, com a quantidade relativa de linfócitos no sentido oposto. O segundo componente explicou 22.84% da variância e foi relacionada com a quantidade relativa de eosinófilos e basófilos em sentidos contrários.

Indivíduos com maior carga parasitária total apresentaram menores taxas metabólicas de repouso (Tabela 7, Figura 4), maiores valores para o primeiro componente morfológico, e maior carga parasitária pulmonar e no trato gastrointestinal (Tabela 7). Os indivíduos com maior carga parasitária pulmonar apresentaram menor desempenho locomotor (Tabela 7, Figura 4) e maiores valores para o primeiro componente morfológico (Tabela 7). Indivíduos com maior quantidade de parasitas no trato gastrointestinal apresentaram menores valores para o primeiro componente do perfil leucocitário (Tabela 7). A massa do baço correlacionou positivamente com o esforço vocal e negativamente com os valores obtidos para o segundo componente do perfil leucocitário (Tabelas 6 e 7). Houve também uma correlação negativa entre os valores obtidos para o segundo componente morfológico e o primeiro componente do perfil leucocitário (Tabelas 5, 6 e 7), e uma correlação positiva entre os valores obtidos para o terceiro componente morfológico e o segundo componente do perfil leucocitário (Tabelas 5, 6 e 7).

Discussão

Os resultados mostram que os indivíduos de *R. icterica* encontrados na natureza são infectados por diversas espécies de parasitas de grupos taxonômicos diferentes, e que esses parasitas infectam diversos órgãos (Tabela 4). Os resultados mostram também correlações da carga parasitária com caracteres morfológicos e fisiológicos, mas não com caracteres comportamentais (Tabela 7). Deve-se salientar, antes mesmo de passar para a discussão mais profunda das relações entre fenótipo do hospedeiro e carga parasitária, que os sapos adultos foram capturados na natureza, quando as suas relações com os parasitas já estão estabelecidas e, potencialmente, por muito tempo. Assim, não podemos discernir se as relações observadas representam um efeito da presença dos parasitas ou se a variação individual da condição fisiológica antes da infecção causou as diferentes cargas parasitárias observadas no presente estudo (Beldomenico and Begon 2010). O cenário mais provável é que a variação individual na condição fisiológica e susceptibilidade à infecção, inicialmente, determinam diferentes cargas parasitárias. Provavelmente, esta variação na carga parasitária ainda transforma os fenótipos dos hospedeiros através de um processo de constante interação.

Parasitas *versus* gradiente de desempenho

As relações encontradas neste estudo entre carga parasitária e as características morfo-fisiológicas corroboram alguns resultados prévios obtidos por Moretti e colaboradores (enviado para publicação) para esta mesma espécie. Houve uma correlação negativa entre carga parasitária e desempenho locomotor, entretanto, a correlação obtida por Moretti e colaboradores (enviado para publicação) se deu com a carga parasitária total, e no presente estudo, com a carga parasitária pulmonar. Esses resultados corroboram a hipótese da relação negativa entre desempenho locomotor e carga parasitária (Tabela 7, figura 5). Vale destacar, entretanto, que *Rhabdias* sp. foi o

parasita com maior prevalência no presente estudo (Tabela 4). A relação encontrada entre desempenho locomotor e carga parasitária pulmonar vai de encontro a conclusões de estudos anteriormente realizados com mamíferos, de que existe uma maior probabilidade de ocorrência de efeitos deletérios da carga parasitária sobre o desempenho do hospedeiro quando os parasitas estão alojados nos trato digestivo, pulmões e circulação, sistemas responsáveis, respectivamente, pela aquisição de nutrientes, trocas dos gases respiratórios e distribuição de nutrientes e gases respiratórios (Schall et al. 1982; Holmes and Zohar 1990; Goater et al. 1993; Kristan and Hammond 2003). Estudos experimentais com Bufonídeos infectados por nematódeos pulmonares têm demonstrado o impacto desses parasitas na sobrevivência do hospedeiro, na taxa de obtenção de alimento, taxa de crescimento e desempenho locomotor de juvenis (Goater et al. 1993; Kelehear et al. 2009). Goater e colaboradores (1993) e Kelehear e colaboradores (2009) sugerem que a presença de parasitas pulmonares deve interferir na troca de gases respiratórios pela destruição das membranas pulmonares, alterar a mecânica de ventilação e obstruir vasos sanguíneos, embora estas hipóteses não tenham sido testadas até então. Adicionalmente, os indivíduos infectados devem alocar recursos energéticos, que seriam usados na sustentação do exercício, para minimizar os danos parasitários. A presença de parasitas pode causar drenos energéticos e nutricionais no hospedeiro via competição direta pelos produtos da digestão e pela estimulação de reparos e resposta imunológica em órgãos danificados (Holmes and Zoar 1990; Lochmiller and Deerenberg 2000; Poulin and George-nascimento 2007). De acordo com Kelehear e colaboradores (2010), o dreno energético causado por nematódeos pulmonares diminui a taxa de crescimento de *Rhinella marina* adultos. Em outro estudo, juvenis de *R. marina* que apresentavam menores desempenhos locomotores eram aqueles que apresentavam menores taxas de

crescimento em decorrência à infecção por nematódeos pulmonares (Kelehear et al. 2009).

Além de a carga parasitária pulmonar encontrar-se negativamente associada a uma reduzida capacidade para realização de exercício aerobicamente sustentado, a carga parasitária total encontra-se associada à diminuição da taxa metabólica de repouso em *R. icterica*, sugerindo que a interferência dos parasitas pode ocorrer não somente na capacidade máxima de transferência de energia no organismo, mas também em seu custo de manutenção (Tabela 7, figura 4). Esses resultados não corroboram a hipótese inicialmente formulada de que a taxa metabólica de repouso estaria correlacionada positivamente com a carga parasitária. Diversos estudos têm mostrado divergências quanto aos efeitos das infecções parasitárias no custo de manutenção dos animais. Aparentemente, existem padrões de alterações diferenciados para endotermos e ectotermos. Em endotermos, geralmente, não há alterações ou há um aumento na taxa metabólica de repouso (Devevey et al. 2009; Kristan and Hammond 2000, 2006; Lochmiller and Deerenberg 2000) enquanto que em ectotermos ou não há alterações ou há uma queda na taxa metabólica de repouso (Oppliger et al. 1996; Arakelova et al. 2003; Schall et al. 1982; Scholnick et al. 2010). Talvez, o fato de que ectotermos apresentam menor requerimento energético e uma homeostase metabólica muito mais flexível quando comparados aos endotermos, faça com que o conflito energético gerado pela infecção parasitária (indução de anorexia e aumento da taxa metabólica associada à ativação e manutenção das células imunes) possa ser compensado por uma redução da taxa metabólica somente em ectotermos. Contudo, são necessários estudos para verificar essa hipótese.

A redução da taxa metabólica de repouso pode aumentar a tolerância dos organismos a fatores estressantes, apesar de impor restrições à aptidão dos indivíduos

(Parsons 1991). Essa diminuição da taxa metabólica em *R. icterica* associada a altas cargas parasitárias poderia ser consequência, pelo menos em parte, de anorexia associada ao parasitismo (Kyriazakis et al. 1998). Em anfíbios, por exemplo, Goater and Ward (1992), Goater et al. (1993) and Kelehear et al. (2009), apesar de não medirem taxa metabólica dos animais, mostraram que infecções experimentais com juvenis de *Bufo bufo* por *Rhabdias bufonis* e *Rhinella marina* por *R. pseudosphaerocephala*, respectivamente, resultaram em redução na captura de presas, taxa de crescimento e sobrevivência dos hospedeiros. Já Moretti e colaboradores (enviado para publicação), apesar de não ter encontrado uma relação entre carga parasitária e taxa metabólica de repouso, encontraram uma correlação negativa entre carga parasitária pulmonar e índice corpóreo em indivíduos machos de *R. icterica* encontrados na natureza, que poderia estar relacionado, possivelmente, a um efeito da anorexia nas reservas energéticas do hospedeiro. Adicionalmente à redução na frequência alimentar, parasitas intestinais podem impor redução da eficiência de assimilação dos nutrientes devido a alterações intestinas de absorção ou motilidade (Holmes and Zohar 1990).

Como mostrado anteriormente por Moretti e colaboradores (enviado para publicação), e corroborando a hipótese formulada, o presente estudo encontrou correlações significativas entre carga parasitária e massas de órgãos. Indivíduos com maior carga parasitária total e pulmonar são aqueles com maiores massas do coração, intestino e rim (Tabela 7). Uma maior massa intestinal deve representar mecanismos compensatórios para os drenos energéticos e nutricionais alocados para os reparos estruturais causados pelos parasitas instalados nos órgãos do hospedeiro, já que os indivíduos com maior carga parasitária total são aqueles com maiores cargas parasitárias nos pulmão e intestino (Tabela 7). Não se pode descartar também um possível efeito direto da presença dos parasitas intestinais gerando uma remodelação do

intestino (Kristan 2002; Schwans 2006). Já a relação positiva entre carga parasitária e remodelação renal representaria evidências da interferência dos parasitas na homeostase dos hospedeiros e/ou estar associada a uma infecção secundária, contudo os mecanismos por trás dessas correlações não são claros (Kristan and Hammond, 2003; Wang et al. 2008).

O aumento da massa cardíaca poderia estar associada aos efeitos causados por *Rhabdias* sp. no pulmão. Devevey e colaboradores (2009) em um trabalho com roedores infectados por pulgas encontraram que animais infestados possuíam uma maior massa cardíaca, do baço e um nível de hematócrito menor. Segundo esses autores uma maior massa cardíaca e, conseqüentemente, um maior volume sistólico, poderia representar um mecanismo compensatório dos efeitos da anemia crônica. Já um baço maior estaria associado a um efeito combinado da ativação do sistema imune e a necessidade em produzir e maturar novas hemáceas. Vale enfatizar que os parasitas pulmonares que infectam *R. icterica* são *Rhabdias* sp. e que esses nematódeos se alimentam de hemáceas, além de terem sido os parasitas com maior prevalência de infecção (Tabela 4), porém, medidas de hematócrito seriam necessárias para testar se estes animais estavam anêmicos também.

Em anfíbios adultos, os locais primários de eritropoiese são o baço, fígado e medula óssea. Além da eritropoiese, o baço é o principal local de granulopoiese de basófilos, o que poderia explicar a relação positiva observada entre massa do baço e a concentração de basófilos em *R. icterica* (Hadji-Azimi et al. 1987; Allender and Fry 2008). Adicionalmente, foi encontrada para *R. icterica* uma correlação positiva entre concentração de eosinófilos e a massa do fígado, sendo este órgão o principal local de granulopoiese de eosinófilos e monócitos (Hadji-Azimi et al. 1987; Allender and Fry 2008). Além dessa relação entre massa dos órgãos e alguns perfis sanguíneos, os

resultados mostram que os neutrófilos são mais relacionados com os linfócitos, corroborando a íntima associação entre esses dois tipos celulares em resposta ao estresse (Benett et al. 1972; Davis et al. 2008). Por outro lado, os eosinófilos são mais relacionados com os basófilos (Tabela 6), sendo que em ambas as relações, neutrófilos/linfócitos e eosinófilos/basófilos, o aumento de um tipo celular está relacionado com a diminuição do outro tipo celular (Tabela 6). Apesar da eosinofilia estar associada ao parasitismo (Allender and Fry 2008), não foi encontrado neste estudo uma correlação entre concentração de eosinófilos com a carga parasitária (Tabela 7), talvez por não haver uma relação linear entre essas duas variáveis. Já em relação aos basófilos pouco se sabe sobre sua função em anfíbios, mas provavelmente, tem ação similar àquela descrita para outros vertebrados, estando associados no processo de inflamação precoce, nas reações de hipersensibilidade imediata e situações de estresse grave (Claver and Quaglia 2009).

Indivíduos com maior carga parasitária no trato gastrointestinal apresentam maior proporção de neutrófilos (N) e menor de linfócitos (L), corroborando a hipótese da correlação positiva da relação neutrófilo:linfócito com a carga parasitária (Tabela 7). Um aumento na proporção de neutrófilos em relação aos linfócitos na circulação sanguínea está associado a diversos fatores estressantes em diferentes vertebrados, sendo esta alteração decorrente do aumento da concentração plasmática de glicocorticóides (Davis et al. 2008). Estudos realizados em mamíferos demonstram que, enquanto a redução do número de linfócitos circulantes em resposta do tratamento com glicocorticóides decorre da sua redistribuição para outros compartimentos, o aumento do número de neutrófilos circulantes decorre do influxo a partir da medula óssea, acompanhado de uma atenuação do recrutamento para outros compartimentos (Bishop et al. 1968; Dhabhar 2002). Em salamandras e rãs, o aumento na proporção entre

neutrófilos e linfócitos foi observado 72 horas após injeção de hidrocortisona (Bennett et al. 1968; 1972). Adicionalmente, um aumento do número de neutrófilos foi observado em sapos expostos a pesticidas (Cabagna et al. 2005), e um aumento da relação N:L foi observada em salamandras no início da temporada reprodutiva (Davis and Maerz 2008a), e em indivíduos em condição de cativeiro (Davis and Maerz 2008b). O fato de que todos os indivíduos incluídos no presente estudo eram machos coletados durante a temporada reprodutiva provavelmente os torna uniformes em relação aos efeitos de alterações sazonais na concentração de corticosterona sobre a relação N:L.

Embora a relação entre estresse e a proporção entre N: L esteja bem estabelecida na literatura, alguns autores tem chamado à atenção o fato de que os efeitos de doenças no perfil leucocitário são similares aos efeitos do estresse, em que neutrofilia e linfopenia são comumente observados em diferentes grupos de vertebrados (Davis et al. 2008). De fato, sendo os neutrófilos fagocíticos, sua proliferação na circulação combate infecções, e poderia acarretar em aumento da proporção N: L durante infecções (Davis et al. 2004). Entretanto, dado que o estresse aumenta a susceptibilidade a doenças e infecções podem aumentar o estresse, estes dois fatores tornam-se difíceis de serem dissociados (Davis et al. 2008). Alguns autores têm sugerido que uma possível distinção entre os efeitos do estresse e da infecção poderia estar associada à observação de outros aspectos do perfil leucocitário. Infecções geralmente resultam em aumento no número de monócitos (Davis et al. 2004), enquanto uma redução no número de eosinófilos encontra-se associado mais comumente ao estresse (Jain 1993). Em anfíbios, existem evidências experimentais de que a corticosterona reduz o número de eosinófilos e reduz a resistência aos parasitas (Belden and Kiesecker, 2005). Dados adicionais sobre a covariação entre carga parasitária, perfil leucocitário, níveis de corticosterona e infecção por microrganismos em *R. icterica* adultos em campo, bem como experimentos de

tratamento hormonal e infecção por parasitas seriam necessários para um melhor esclarecimento destas questões.

Parasitas versus gradiente de aptidão

Os resultados mostram uma relação positiva entre a massa do baço com o esforço vocal dos indivíduos (Tabela 7). Talvez, esta relação possa estar associada à necessidade do organismo em suprir a musculatura vocal em exercício com oxigênio, sendo esta atividade altamente aeróbia e figurando entre as atividades de maior dispêndio energético já medidas para vertebrados ectotérmicos (Pough et al. 1992; Wells 2001). Uma possibilidade para suprir a musculatura com oxigênio é aumentar a capacidade carreadora de oxigênio do sangue, aumentando a quantidade de eritrócitos na circulação, através do baço (Allender and Fry 2008).

Os resultados obtidos não mostram relações entre caracteres comportamentais e variáveis parasitárias, não corroborando a hipótese da relação negativa entre esforço vocal e carga parasitária, e contrariando o que deveria ser esperado pelo modelo de seleção intersexual mediada por parasitas (Hamilton and Zuk 1982; Folstad and Karter 1992). Segundo Hamilton and Zuk (1982) e Folstad and Karter (1992) deveria haver uma correlação negativa entre as características comportamentais energeticamente exigentes, como a manutenção de altas taxa de vocalização, com a carga parasitária dos machos, indicando a qualidade desses machos. Contudo, em anfíbios é comum encontrar, na literatura, diferentes relações entre as variáveis reprodutivas comportamentais e variáveis parasitárias. Hausfater (1990), por exemplo, não encontrou relações entre carga parasitária e duração da vocalização de *Hyla versicolor*, e mostrou que os indivíduos em amplexo tinham uma carga parasitária maior que os indivíduos que não estavam acasalando. Pfennig and Tinsley (2002) estudaram a seleção sexual em

Scaphiopus couchii dos Estados Unidos e observaram que, ao contrário do que se esperava, os machos parasitados apresentavam melhores condições físicas e emitiam vocalizações longas com maior frequência quando comparados machos não parasitados. Estes autores verificaram que as fêmeas desta espécie, quando não parasitadas, preferem vocalizações longas e, portanto, os machos parasitados seriam escolhidos. Já Madelaire e colaboradores (enviado para publicação) investigaram as relações entre carga parasitária e comportamento vocal em duas populações de *Hypsiboas prasinus* que diferiam em densidade do coro, e encontrou uma relação negativa entre carga parasitária em diferentes órgãos com características temporais das vocalizações. Entretanto, os resultados foram muito mais claros para a população de maior densidade de coro, estimulando os indivíduos a vocalizarem a taxa mais próxima de seu desempenho máximo, indicando a importância do ambiente social na determinação da força da correlação com a carga parasitária. Contudo, *Hypsiboas prasinus* é uma espécie de reprodução prolongada, onde a seleção intersexual pode representar um forte componente do sucesso reprodutivo (Castellano et al. 2009). Por outro lado, Bufonídeos em geral são caracterizados por reprodução explosiva onde é mais comum a ocorrência de procura ativa e disputas entre machos pela posse das fêmeas (Wells 1977). Desta maneira, para *R. icterica*, a relação entre carga parasitária e outros aspectos do fenótipo, como desempenho locomotor, poderiam afetar o sucesso reprodutivo dos machos e, conseqüentemente, a aptidão dos indivíduos, já que indivíduos resistentes conseguiram suportar por mais tempo atividade locomotora e abranger uma área maior à procura de fêmeas. Entretanto, para testar estas hipóteses de relação entre carga parasitária, comportamento reprodutivo e aptidão, estudos adicionais devem ser realizados.

Conclusões:

Machos adultos de *Rhinella icterica* encontrados na natureza são infectados por helmintos de diferentes grupos taxonômicos. Adicionalmente, indivíduos de *R. icterica* com maiores cargas parasitárias (total, pulmonar e/ou do trato gastro-intestinal) apresentaram aumento das massas intestinais, renais e cardíacas; aumento da relação neutrófilos:linfócitos; queda da taxa metabólica de repouso; queda do desempenho locomotor. Desta maneira, este estudo conclui que a ação e atuação dos parasitas estão relacionadas a diversos aspectos da organização hierárquica do fenótipo, incluindo tanto aspectos fisiológicos e morfológicos associados ao custo energético de manutenção quanto ao desempenho locomotor. Ao menos um dos componentes associados à seleção sexual, o esforço vocal, não guarda relação com a carga parasitária nesta espécie.

Bibliografia

- Allender MC, Fry MM (2008) Amphibian hematology. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice* 11:463-80, VI.
- Andersson M (1994) *Sexual selection*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Arakelova ES, Chebotareva M a, Zabelinskii S (2003) On Adaptative Changes of Rates of Oxygen Consumption and Lipid Metabolism in *Littorina saxatilis* at Parasitic Invasions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 39:519-528.
- Arnold SJ (1983) Morphology, Performance and Fitness. *American Zoologist* 23:347-361.
- Barnard CJ, Behnke JM (1990) Parasitism and host behavior. Taylor & Francis, London, UK.
- Belden LK, Kiesecker JM (2005) Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by *Alaria* sp. trematode cercariae. *Journal of Parasitology* 91:686–688.
- Beldomenico PM, Begon M (2010) Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends in ecology & evolution* 25:21-7.
- Bennett AF (1991) The evolution of activity capacity. *Journal of Experimental Biology* 160:1-23.
- Bennett AF, Huey RB (1990) Studying the evolution of physiological performance. *Oxford Surveys of Evolutionary Biology* 7: 251-284.
- Bennett MF, Gaudio CA, Johnson AO & Spisso JH (1972) Changes in the blood of newts, *Notophthalmus viridescens*, following administration of hydrocortisone. *Journal of Comparative Physiology A*, 80, 233–237.
- Bennett MF, Harbottle JA (1968) The effects of hydrocortisone on the blood of tadpoles and frogs, *Rana catesbeiana*. *Biological Bulletin* 135: 92–95.
- Benton MJ (2010) New take on the Red Queen. *Nature* 463:306-307.
- Bevier CR (1995) Biochemical correlates of calling activity in neotropical frogs. *Physiological Zoology* 68:1118-1142.
- Bishop CR, Athens JW, Boggs DR, Warner HR, Cartwrig Ge & Wintrobe MM (1968) Leukokinetic Studies 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *Journal of Clinical Investigation* 47: 249p.

- Brown GP, Shilton CM, Shine R (2006) Do parasites matter? Assessing the fitness consequences of haemogregarine infection in snakes. *Canadian Journal of Zoology* 84:668-676.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* 83(4):575-583.
- Cabagna MC, Lajmanovich RC, Stringhini G, Sanchez-Hernandez JC & Peltzer PM (2005) Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology* 2:373–380.
- Carval D, Ferriere R (2010) A unified model for the coevolution of resistance, tolerance, and virulence. *Evolution; international journal of organic evolution* 64:2988-3009.
- Castellano S, Zanollo V, Marconi V, Berto G (2009) The mechanisms of sexual selection in a lek-breeding anuran, *Hyla intermedia*. *Animal Behaviour* 77:213-224.
- Claver J a, Quaglia AIE (2009) Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:87-97.
- Clobert J, Oppliger A, Sorci G, Ernande B, Swallow JG, Garland TJ (2000) Trade-offs in phenotypic traits: endurance at birth, growth survival, predation and susceptibility to parasitism in a lizard, *Lacerta vivipara*. *Functional Ecology* 14:675-684.
- Coop RL, Holmes PH (1996) Nutrition-parasite interactions. *International Journal for Parasitology* 26:951-962.
- Davis a K, Maney DL, Maerz JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22:760-772.
- Davis AK, Maerz JC (2008b) Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* 2008:613–617.

- Davis AK, Cook KC, Altizer S (2004) Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *Ecohealth* 1:362–373.
- Davis AK, Maerz JC (2008a) Sex-related differences in hematological stress indices of breeding, paedomorphic mole salamanders. *Journal of Herpetology* 42:197–201.
- Devevey G, Bize P, Fournier S, Person E, Christe P (2009) Testing the predictive adaptive response in a host-parasite system. *Functional Ecology*:1-8.
- Dhabhar FS (2002) A hassle a day may keep the doctor away: stress and the augmentation of immune function. *Integrative and Comparative Biology* 42:556–564.
- Dingemanse NJ, Oosterhof C, Van Der Plas F, Barber I (2009) Variation in stickleback head morphology associated with parasite infection. *Biological Journal of the Linnean Society* 96:759-768.
- Ezard THG, Aze T, Pearson PN, Purvis A (2011) Interplay Between Changing Climate and Species' Ecology Drives Macroevolutionary Dynamics. *Science* 332:349-351.
- Fernandes MS, Giusti H & Glass ML (2005) An assessment of dead space in pulmonary ventilation of the toad *Bufo schneideri*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 142: 446-450.
- Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *The American Naturalist* 139:603-622.
- Gandon S, Agnew P, Michalakis Y (2002) Coevolution between parasite virulence and host life-history traits. *The American naturalist* 160:374-88.
- Garland Jr T, Carter PA (1994) Evolutionary physiology. *Annual Review of Physiology* 56:579-621.
- Goater CP (1994) Growth and Survival of Postmetamorphic Toads: Interactions among Larval History, Density, and Parasitism. *Ecology* 75:2264-2274.
- Goater CP, Semlitsch RD, Bernasconi MV (1993) Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. *Oikos* 66:129-136.

- Goater CP, Ward PI (1992) Negative effects of *Rhabdias bufonis* (Nematoda) on the growth and survival of toads (*Bufo bufo*). *Oecologia* 89:161–165.
- Gomes FR (2002) *Estudo comparativo das inter-relações entre comportamento, ecologia térmica e fisiologia metabólica no gênero Scinax (Anura: Hylidae)*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., Brasil.
- Hadji-Azimi I, Coosemans V, Canicatti C (1987) Atlas of Adult *Xenopus laevis laevis* Hematology. *Developmental and Comparative Immunology* 11:807-874.
- Haldane JBS (1992) Disease and evolution. *Current science (reproduced from La Ricerca Scientifca Supplemento, 1949, 19, 1-11)* 63:599-602.
- Hamilton WD (1980) Sex versus Non-Sex versus Parasite. *Oikos* 35:282-290.
- Hamilton WD, Axelrod R, Tanese R (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:3566-73.
- Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable True Fitness and Bright Birds: A Role for Parasites? *Science* 218:384-387.
- Hasselgren PO and Fischer JE (1998) Sepsis: stimulation of energy-dependent protein breakdown resulting in protein loss in skeletal muscle. *World Journal of Surgery* 22:203–208.
- Hatcher MJ, Dick JTA, Dunn AM (2006) How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology letters* 9(11):1253-71.
- Hausfater G, Gerhardt HC, Klump GM (1990) Parasites and Mate Choice in Gray Treefrogs , *Hyla versicolor*. *American Zoologist* 30:299-311.
- Heatley JJ, Johnson M (2009) Clinical Technique: Amphibian Hematology: A Practitioner's Guide. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:14-19.
- Hinds DS, Baudinette RV, MacMillen RE and Halpern EA (1993) Maximum metabolism and the aerobic factorial scope of endotherms. *Journal of Experimental Biology* 182:41-56.
- Hinshaw SH and Sullivan BK (1990) Predation on *Hyla versicolor* and *Pseudacris crucifer* during reproduction. *Journal of Herpetology* 24: 196–197.

- Holmes JC and Zohar S (1990) Pathology and host behavior. In: Barnard C. J. and Behnke J. M. (eds), *Parasitism and host behaviour*. University of Nottingham, UK. Taylor and Francis, London, pp. 34-63.
- Hoppeler H and Weibel ER (1998) Limits for oxygen and substrate transport in mammals. *The Journal of experimental biology* 201:1051-64.
- Irschick DJ and T Garland Jr (2001) Integrating function and ecology in studies of adaptation: investigations of locomotor capacity as a model system. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 32:367-396.
- Jain NC (1993) *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA.
- Jakob EM, Marshall SD, Uetz GW (1996) Estimating Fitness: A Comparison of body condition indices. *Oikos* 77(1):61-67.
- James RS, Wilson RS, Carvalho JE, Kohlsdorf T, Gomes FR. & Navas CA (2006) Interindividual differences in leg muscle mass and pyruvate kinase activity correlate with interindividual differences in jumping performance in *Hyla multilineata*. *Physiological and Biochemical Zoology* 78:857-867.
- Jim J (2002) *Distribuição altitudinal e estudo de longa duração de anfíbios na região de Botucatu, Estado de São Paulo*. Tese de Livre Docência apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu.
- Johnson PTJ, Lunde KB, Ritchie EG, Launer AE (1999) The Effect of Trematode Infection on Amphibian Limb Development and Survivorship. *Science* 284:802.
- Kelehear C, Brown GP, Shine R (2010) Influence of lung parasites on the growth rates of free-ranging and captive adult cane toads. *Oecologia*.
- Kelehear C, Webb JK, Shine R (2009) *Rhabdias pseudosphaerocephala* infection in *Bufo marinus*: lung nematodes reduce viability of metamorph cane toads. *Parasitology* 136:919-27.
- Kolluru GR, Grether GF, Dunlop E, South SH (2008) Food availability and parasite infection influence mating tactics in guppies (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology* 20:131-137.

- Kristan DM (2002) Effects of intestinal nematodes during lactation, consequences for host morphology, physiology and offspring mass. *The Journal of Experimental Biology* 205:3955-3965.
- Kristan DM, Hammond KA (2000) Combined effects of cold exposure and sub-lethal intestinal parasites on host morphology and physiology. *Journal of Experimental Biology* 203:3495-3504.
- Kristan DM, Hammond KA (2003) Physiological and morphological responses to simultaneous cold exposure and parasite infection by wild-derived house mice. *Functional Ecology* 17:464-471.
- Kristan DM, Hammond KA (2004) Morphological plasticity varies with duration of infection: evidence from lactating and virgin wild-derived house mice (*Mus musculus*) infected with an intestinal parasite (*Heligmosomoides polygyrus*; Nematoda). *Journal of Experimental Biology* 207:2351-2360.
- Kristan DM, Hammond KA (2006) Effects of three simultaneous demands on glucose transport, resting metabolism and morphology of laboratory mice. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 176:139-151.
- Kyriazakis I, Tolkamp B, Hutchings M (1998) Towards a functional explanation for the occurrence of anorexia during parasitic infections. *Animal behaviour* 56:265-274.
- Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87-98.
- Madelaire CB, Silva RJ, Gomes FR. Calling behavior and parasite load in two populations of the treefrog *Hypsiboas prasinus*, Enviado para publicação: *Behavior ecology*.
- Medoc V, Beisel JN (2008) An acanthocephalan parasite boosts the escape performance of its intermediate host facing non-host predators. *Parasitology* 135:977-984.
- Moller a P (2008) Flight distance and blood parasites in birds. *Behavioral Ecology* 19:1305-1313.
- Moore SL, Wilson K (2002) Parasites as a Viability Cost of Sexual Selection in Natural Populations of Mammals. *Science* 297:2015.

- Moretti EH, Madelaire CB, Silva RJ, Mendonça MT, Gomes FR. The relationships between parasite load, locomotor performance, and body condition in adult toads (*Rhinella icterica*) from the wild. Enviado para publicação: *Journal of Herpetology*.
- Navas CA, Araujo C (2000) The use of agar models to study amphibian thermal ecology. *Journal of Herpetology* 34:330-334.
- Oppliger A, Célrier ML, Clobert J (1996). Physiological and behaviour changes in common lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitology* 113:433-438.
- Parsons PA (1991) Evolutionary rates: stress and species boundaries. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 22:1-18.
- Parsons PA (2005) Environments and evolution: interactions between stress, resource inadequacy and energetic efficiency. *Biological Reviews* 80:589-610.
- Penna M, Narins PM, Feng AS (2005) Thresholds for evolved vocal responses of *Eusophus emiliopugini* (Amphibia, Leptodactylidae). *Herpetologica* 61:1-8.
- Pfennig KS, Tinsley RC (2002) Different mate preferences by parasitized and unparasitized females potentially reduces sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology* 15:399-406.
- Pough FH, Magnusson WE, Ryan MJ, Wells KD & Taigen TL (1992) Behavioral energetics. In: *Environmental Physiology of Amphibians*. M.E. Feder & W.W. Burggren (eds.). University of Chicago Press, Chicago. 395-436pp.
- Poulin R, George-nascimento M (2007) The scaling of total parasite biomass with host body mass. *International Journal of Parasitology* 37:359-364.
- Pramuk JB, Robertson T, Sites JW, Noonan BP (2008) Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography* 17:72-83.
- Ressel SJ (1996) Ultrastructural properties of muscles used for call production in neotropical frogs. *Physiological Zoology* 69:952-973.
- Rice W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Ricklefs RE, Wikelski M (2002) The physiology/life- history nexus. *Trends in Ecology & Evolution* 17:462-468.

- Roberts HC, Hardie LJ, Chappell LH, Mercer JG (1999) Parasite-induced anorexia: leptin, insulin and corticosterone responses to infection with the nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology* 118 Pt 1:117-23.
- Schall JJ, Bennett AF, Putman RW (1982) Lizards infected with malaria : physiological and behavioral consequences. *Science* 217:1057-1059.
- Scholnick D a, Manivanh RV, Savenkova OD, Bates TG, McAlexander SL (2010) Impact of Malarial Infection on Metabolism and Thermoregulation in the Fence Lizard *Sceloporus occidentalis* from Oregon. *Journal of Herpetology* 44:634-640.
- Schulte RD, Makus C, Hasert B, Michiels NK, Schulenburg H (2010) Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:7359-64.
- Schulte-Hostedde AI, Zinner B, Millar JS, Hickling GJ (2005) Restitution of Mass–Size Residuals: Validating Body Condition Indices. *Ecology* 86:155-163.
- Schwanz LE (2006) Schistosome infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): impacts on host physiology, behavior and energetics. *Journal of Experimental Biology* 209:5029-5030.
- Smales LR (2007) Acanthocephala in amphibians (Anura) and Reptiles (Squamata) from Brazil and Paraguay with description of a new species. *Journal of Parasitology* 93(2):392-398.
- Stenseth NC, Smith JM (1984) Coevolution in Ecosystems : Red Queen Evolution or Stasis ? *Evolution* 38:870-880.
- Stevaux MN (2002) A new species of Bufo Laurenti (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 19:235 - 242.
- Stjernman M, Raberg L, Nilsson J-A (2008) Maximum Host Survival at Intermediate Parasite Infection Intensities. *PloS one* 3:e2463.
- Sullivan BK (1991) Parasites and sexual selection: separating causes and effects. *Herpetologica* 47, 250–264.

- Sullivan BK, Kwiatkowski M a (2007) Courtship displays in anurans and lizards: theoretical and empirical contributions to our understanding of costs and selection on males due to female choice. *Functional Ecology* 21:666-675.
- Taigen TL (1983) Activity metabolism of anuran amphibians: implications for the origin of endothermy. *American Naturalist* 121:94-109.
- Taylor CR, Heglund N, Maloiy GMO (1982) Energetics and mechanics of terrestrial locomotion. I. Metabolic energy consumption as a function of speed and body size in birds and mammals. *Journal of Experimental Biology* 97:1-21.
- Thomas F, Poulin R, Brodeur J (2010) Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* 119:1217-1223.
- Thompson SN (1990) Physiological alterations during parasitism and their effects on host behaviour. In: Barnard C. J. and Behnke J. M. (eds), *Parasitism and host behaviour*. University of Nottingham, UK. Taylor and Francis, London, pp. 64-94.
- Tinsley RC (1990) The Influence of Parasite Infection on Mating Success in Spadefoot Toads , *Scaphiopus couchii*. *American Zoologist* 30:313-324.
- Tinsley RC, Cable J, Porter R (2002) Pathological effects of *Pseudodiploorchis americanus* (Monogenea: Polystomatidae) on the lung epithelium of its host, *Scaphiopus couchii*. *Parasitology* 125:143-53.
- Tompkins DM, Dunn AM, Smith MJ, Telfer S (2010) Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. *The Journal of animal ecology* 4:19-38.
- Travassos L, Freitas JFT e Kohn A (1969) *Trematódeos do Brasil*. Library of Congress, Rio de Janeiro, BR.
- Valen LV (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30.
- Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM (1990) Nematóides do Brasil Parte II: Nematóides de anfíbios. *Revista Brasileira de Zoologia* 7(4):549-626.
- Wang Y, Utzinger J, Saric J, Li JV, Burckhardt J, Dirnhofer S, Nicholson JK, Singer BH, Brun R, Holmes E (2008) Global metabolic responses of mice to *Trypanosoma brucei brucei* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:6127–6132.

- Wells KD (1977) The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behavior* 25:666-693.
- Wells KD (1988) The effect of social interactions on anuran vocal behavior. In: *The evolution of the amphibian auditory system*, ed. B Frittsch, MJ Ryan, W Wilczynski, TE Hetherington, W Walkowiak, 433-454. New York: Wiley.
- Wells KD (2001) The energetics of calling in frogs. Pp. 45-60. In: M.J. Ryan (ed.). *Anuran communication*. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Wikelski M, Romero ML (2003) Body Size, Performance and Fitness in Galapagos Marine Iguanas. *Integrative and Comparative Biology* 43:376-386.
- Willmore KE, Young NM, Richtsmeier JT (2007) Phenotypic Variability: Its Components, Measurement and Underlying Developmental Processes. *Evolutionary Biology* 34:99-120.
- Zahavi a (1975) Mate selection: a selection for a handicap. *Journal of theoretical biology* 53:205-14.
- Zahavi a (1977) The cost of honesty (further remarks on the handicap principle). *Journal of theoretical biology* 67:603-5.
- Zhong D, Pai A, Yan G (2005) Costly Resistance to Parasitism: Evidence From Simultaneous Quantitative Trait Loci Mapping for Resistance and Fitness in *Tribolium castaneum*. *Genetics* 169:2127-2135.
- Zuk M, McKean KA (1996) Sex Differences in Parasite Infections: Patterns and Processes. *International Journal for Parasitology* 26:1009-1024.



Figura 1. *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae), espécie utilizada no presente estudo.



Figura 2. Pista circular utilizada nos testes de desempenho locomotor de *Rhinella icterica*.

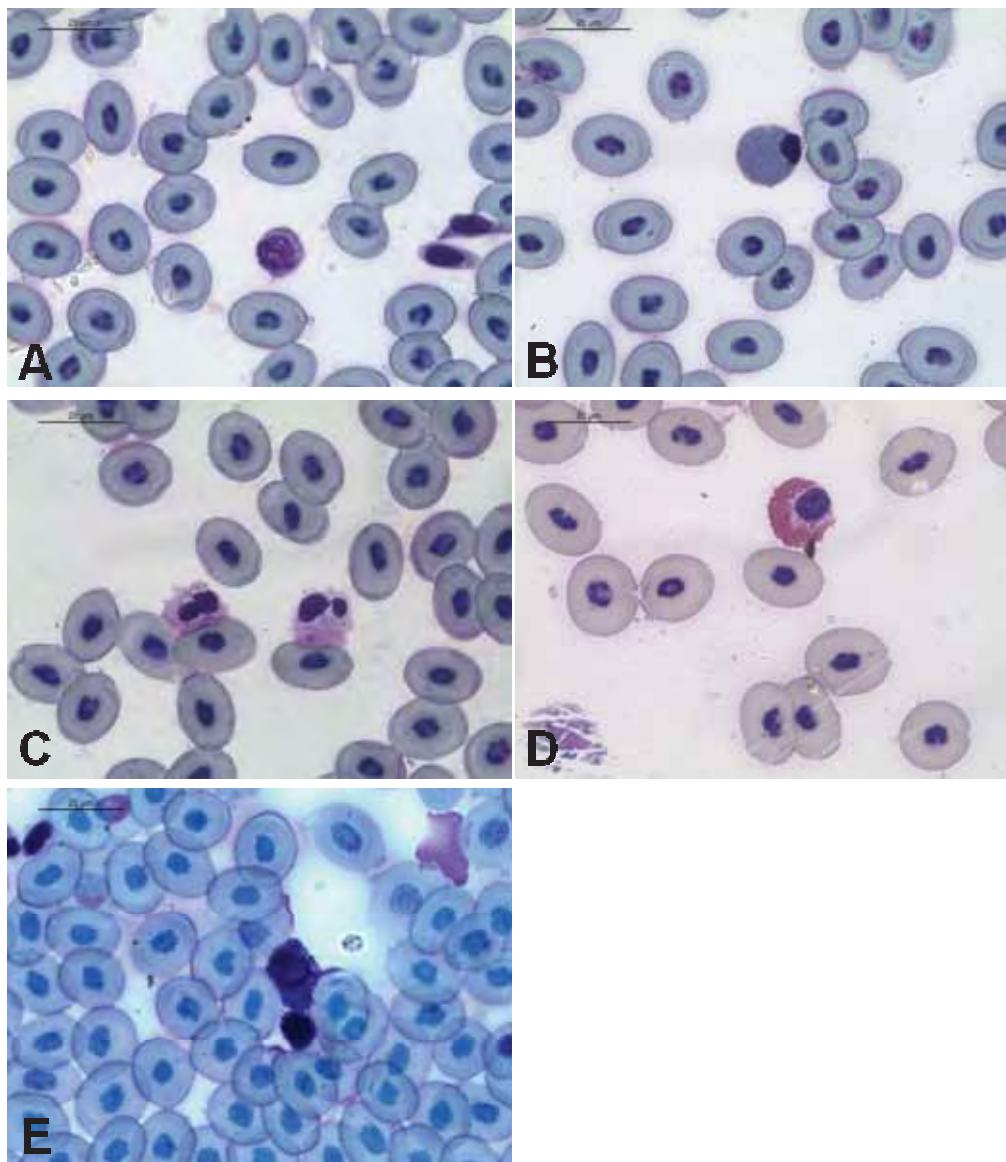


Figura 3. Esfregaços sanguíneos com diferentes tipos de leucócitos de *Rhinella icterica* corados com panótico rápido (kit Giemsa). Imagens obtidas a partir de um microscópio de luz com lente objetiva de 100x, em óleo de imersão. (A) eritrócitos com um linfócito ao centro e dois trombócitos à direita do linfócito; (B) eritrócitos com um monócito ao centro; (C) eritrócitos com dois neutrófilos ao centro; (D) eritrócitos com um eosinófilo ao centro e (E) eritrócitos com dois basófilos ao centro, sendo que o basófilo superior encontra-se em processo degranulativo.

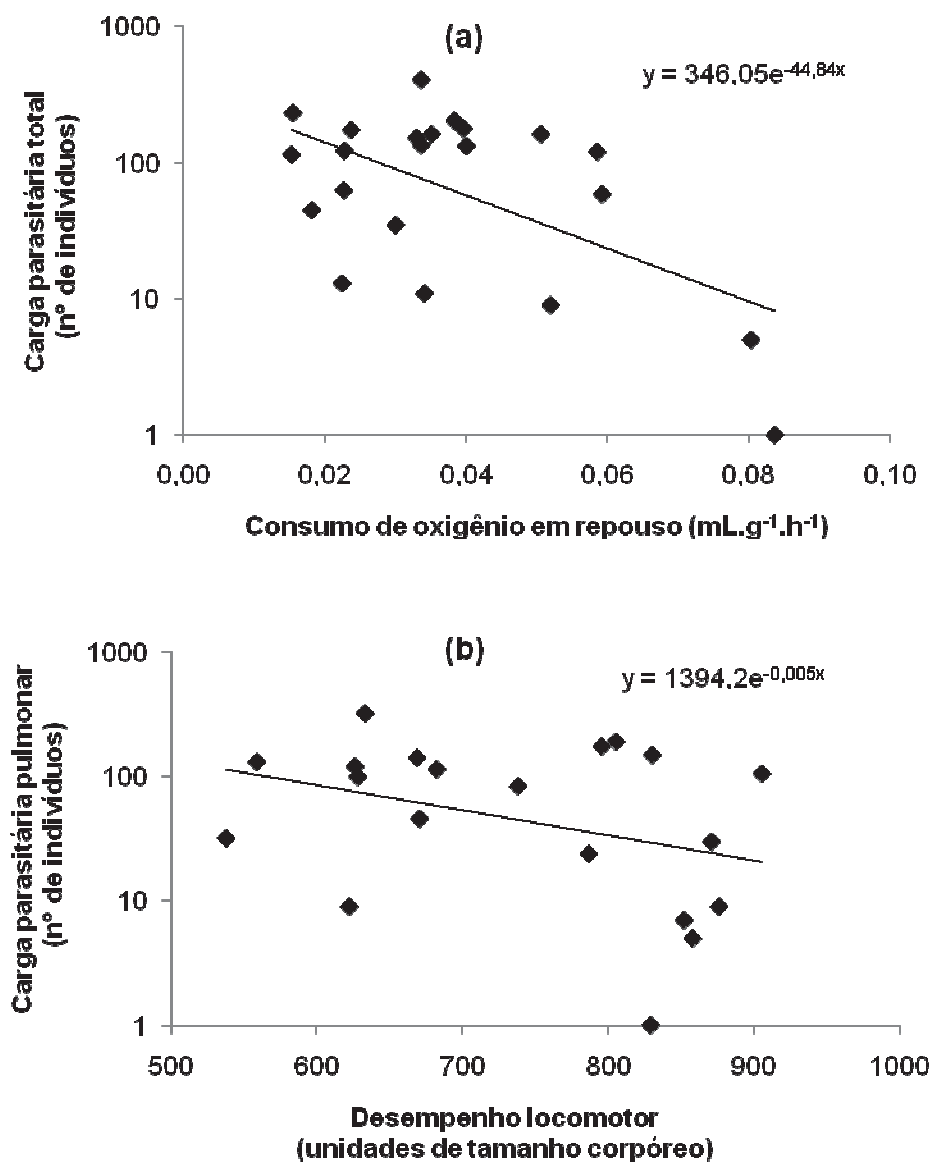


Figura 4. Relações entre carga parasitária e variáveis fisiológicas de *Rhinella icterica*: (a) relação entre consumo de oxigênio em repouso e carga parasitária total; (b) relação entre desempenho locomotor e carga parasitária pulmonar.

Tabela 1. Análise descritiva da carga parasitária e das variáveis ambientais, comportamentais, fisiológicas e morfológicas de *Rhinella icterica*.

Variáveis	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Intervalo confiança	
						-95.00%	+95.00%
Parasita total (un)	28	198.82	406.38	0.00	2206.00	41.24	356.40
Parasita pulmonar (un)	28	26.93	32.07	0.00	135.00	14.49	39.37
Parasita trato gastro-intestinal (un)	28	110.57	408.33	0.00	2187.00	-47.76	268.91
Esforço vocal (s)	23	285.39	198.36	0.00	673.00	199.61	371.17
Temperatura corpórea (°C)	25	18.84	2.94	13.00	23.00	17.63	20.05
Temperatura do ar (°C)	24	15.98	1.74	12.40	18.40	15.25	16.72
Temperatura da água (°C)	24	19.70	3.05	14.60	23.20	18.41	20.99
Umidade relativa do ar (%)	24	89.84	3.93	81.40	94.20	88.18	91.50
Comprimento rostro-cloacal (CRC) (m)	26	0.12	0.01	0.09	0.15	0.12	0.13
Distância percorrida (m)	22	89.29	14.72	64.38	126.26	82.76	95.81
Desempenho locomotor (unidades CRC)	20	738.81	115.40	537.73	905.64	684.80	792.82
V,O ₂ std (mLO ₂ .g ⁻¹ .h ⁻¹)	22	0.04	0.02	0.02	0.08	0.03	0.05
Massa úmida (g)	28	161.48	58.36	59.38	315.25	138.85	184.11
Massa seca (g)	22	37.25	13.84	21.07	82.15	31.11	43.38
Carcça (g)	22	33.27	12.06	18.43	72.39	27.93	38.62
Coração (g)	22	0.10	0.04	0.06	0.24	0.08	0.12
Fígado (g)	22	0.84	0.41	0.40	2.19	0.66	1.02
Intestino (g)	22	0.33	0.09	0.22	0.55	0.29	0.37
Rim (g)	22	0.09	0.05	0.03	0.22	0.07	0.11
Baço (g)	18	0.01	0.01	0.00	0.03	0.01	0.02
Neutrófilo (%)	28	28.00	21.00	2.00	94.00	19.00	36.00
Eosinófilo (%)	28	7.00	6.00	0.00	22.00	5.00	10.00
Linfócito (%)	28	60.00	20.00	4.00	95.00	53.00	68.00
Monócito (%)	28	1.00	1.00	0.00	5.00	1.00	2.00
Basófilo (%)	28	4.00	4.00	0.00	12.00	2.00	5.00

Un – número de indivíduos, V,O₂std – taxa de consumo de oxigênio padronizada.

Tabela 2. Correlações entre variáveis ambientais, temperatura corpórea e esforço vocal de *Rhinella ictercia*.

Variáveis	Temperatura do ar	Temperatura da água	Umidade relativa	Esforço vocal
Temperatura corpórea	0.75*(21)	0.50(21)	0.53(21)	-0.19(20)
Temperatura do ar		0.82*(24)	0.53(21)	0.03(19)
Temperatura da água			0.37(24)	0.15(19)
Umidade relativa				0.01(19)

(N). Temperaturas corpórea, do ar, da água e umidade relativa estão expressos como $\log_{10}$ dos valores absolutos. Significância, correlações não ajustadas estão destacadas em negrito; os valores absolutos de $r > 0.50$ permanecem significativos em P de 0.05, e valores absolutos de $r > 0.75$ permanecem significativos em P de 0.01. Correlações significativas depois da múltipla correção seqüencial de Bonferroni, testes simultâneos dentro de sub-tabelas (Rice, 1989), estão indicadas com um asterisco.

Tabela 3. Equações de regressões para diferentes variáveis de *Rhinella icterica*

Variáveis	Alfa±EP	Beta±EP	R ²	P
Coração	-2.35±0.21	0.85±0.13	0.68	<0.001
Fígado	-1.91±0.16	1.16±0.10	0.86	<0.001
Intestino	-1.19±0.24	0.45±0.15	0.29	0.009
Rim	-2.87±0.31	1.15±0.20	0.63	<0.001
Baço	-3.25±0.50	0.85±0.31	0.31	0.016
Índice corpóreo	-0.15±0.11	0.10±0.07	0.10	0.177
Neutrófilo	-1.28±1.03	0.30±0.66	0.01	0.657
Eosinófilo	0.48±1.09	-1.02±0.70	0.10	0.162
Linfócito	-0.20±0.26	0.01±0.17	0.00	0.974
Monócito	4.21±1.94	-3.29±1.25	0.26	0.016
Basófilo	1.85±1.59	-1.79±1.02	0.13	0.094
Neutrófilo/ Linfócito	-1.08±1.25	0.29±0.81	0.01	0.720
Desempenho locomotor	2.99±0.18	-0.08±0.12	0.03	0.498
V,O ₂ std	-0.77±0.49	-0.44±0.32	0.10	0.177
Esforço vocal	-1.61±2.34	2.45±1.53	0.15	0.130
Parasita total	2.39±1.59	-0.38±1.02	0.71	0.712
Parasita pulmonar	0.85±1.54	0.16±0.99	0.87	0.871
Parasita trato gastro-intestinal	3.56±1.39	-1.52±0.90	0.11	0.106

Valores de *P* significativos estão destacados em negrito (< 0.05). EP: Erro Padrão.

Tabela 4. Prevalência, intensidade média e abundância média de helmintos em diferentes órgãos de *Rhinella icterica*

Espécie de Helmintos	Prevalência	Intensidade média	Abundância média	Local de infecção
Acanthocephala <i>Acanthocephalus saopaulensis</i>	46.4%	12.54±4.43* (1-55)	5.82±2.34* (0-55)	ID, IG
Nematoda <i>Physaloptera</i> sp.	7.1%	1.00±0.00 (1-1)	0.07±0.05 (0-1)	Estômago, IG
<i>Oswaldocruzia subauricularis</i>	78.6%	7.73±1.53 (1-28)	6.07±1.34 (0-28)	ID, IG, Estômago
<i>Rhabdias</i> sp.	89.3%	30.16±6.50 (1-135)	26.93±6.06 (0-135)	Pulmão
Cosmocercidae	64.3%	31.00±8.64 (1-115)	19.93±6.20 (0-115)	ID, IG
<i>Falcaustra máscula</i>	3.6%	6.00 (6-6)	0.21±0.21 (0-6)	IG
Trematoda <i>Mesocoelium monas</i>	10.7%	731.67±726.17 (4-2184)	78.39±77.98 (0-2184)	ID
Não identificado	3.6%	2.00±18.04 (2-58)	0.07±2.07 (0-58)	IG, Bexiga

*Valores representam média ± erro padrão; (variação). ID - Intestino delgado; IG - Intestino grosso

Tabela 5. Componentes principais gerados a partir das variáveis morfológicas de *Rhinella icterica* (N=20)

Variáveis	Componentes Principais		
	M1	M2	M3
Coração	0.82	0.17	-0.05
Fígado	0.00	0.00	0.96
Intestino	0.81	-0.01	-0.12
Rins	0.80	-0.13	0.35
Massa seca	0.08	0.79	0.11
Índice corpóreo	-0.04	0.82	-0.13
% Variância total	33.65	22.72	17.30

Massa seca e índice corpóreo estão expressos como $\log_{10}$ de valores absolutos. Coração, fígado, intestino e rins são residuais log-log de regressões de massa seca. Variáveis que mais contribuem para cada componente estão destacados em negrito. A quantidade total de variância nos dados que podem ser explicados usando esses três primeiros componentes é 73.67%.

Tabela 6. Componentes principais gerados a partir das variáveis sanguíneas de *Rhinella icterica* (N=28)

Variáveis	Componentes Principais	
	S1	S2
Neutrófilo (NT)	-0.93	0.10
Eosinófilo	0.04	0.73
Linfócito (LF)	0.88	0.17
Basófilo	0.00	-0.76
NT/LF	-1.00	0.00
% Variância total	52.98	22.84

Neutrófilo, eosinófilo, linfócito, basófilo e NT/LF estão expressos com $\log_{10}$ de valores absolutos. Variáveis que mais contribuem para cada componente estão destacados em negrito. A quantidade total de variância nos dados que podem ser explicados usando esses dois primeiros componentes é 75.82%.

Tabela 7. Correlações entre carga parasitária (total e nos órgãos) com variáveis comportamentais, fisiológicas e morfológicas de *Rhinella icterica*.

Variáveis	Monócito	Desempenho locomotor	VO ₂ std	Esforço vocal	Parasita total [#]	Parasita pulmonar	Parasita gastro-intestinal	SCORES MORFOLÓGICOS			SCORES PERFIL LEUCOCITÁRIO	
								Scores M1	Scores M2	Scores M3	Scores PL1	Scores PL2
Baço	0.15(18)	0.32(16)	-0.35(18)	0.56(13)	0.23(18)	-0.03(18)	0.41(18)	0.26(16)	-0.1(16)	-0.03(16)	0.28(18)	-0.55(18)
Monócito		0(20)	0.11(22)	-0.31(17)	-0.03(22)	-0.24(22)	0.13(22)	0.02(20)	-0.04(20)	0.24(20)	-0.36(22)	-0.13(22)
Desempenho locomotor			0.02(20)	-0.26(15)	-0.39(20)	-0.49(20)	-0.11(20)	-0.42(20)	0.08(20)	-0.27(20)	0.03(20)	-0.34(20)
VO ₂ std				-0.36(17)	-0.45(22)	-0.4(22)	-0.32(22)	-0.05(20)	-0.24(20)	-0.08(20)	0.16(22)	-0.05(22)
Esforço vocal					0.06(23)	0.14(23)	0(23)	0.24(15)	-0.02(20)	-0.07(15)	0.19(23)	0(23)
Parasita total [#]						0.64*(28)	0.87*(28)	0.53(20)	0.08(20)	-0.09(20)	-0.31(28)	-0.08(28)
Parasita pulmonar							0.3(28)	0.64(20)	-0.09(20)	-0.11(20)	0.1(28)	0.26(28)
Parasita gastro-intestinal								0.43(20)	-0.04(20)	-0.21(20)	-0.41(28)	-0.25(28)
Scores M1									0(20)	0(20)	-0.22(20)	0.01(20)
Scores M2										0(20)	-0.46(20)	0.29(20)
Scores M3											-0.16(20)	0.46(20)
Scores PL1												0(28)

(N). [#]Parasita total corresponde ao número de parasitas, exceto aqueles que estão alojados nos órgãos correlacionados. Desempenho locomotor, VO₂std, esforço vocal, parasita total, parasita pulmonar e parasita gastro-intestinal estão expressos como log₁₀ dos valores absolutos. Baço e monócito são residuais log-log de regressões de massa seca. Scores M1, M2, M3, PL1 e PL2 são resultantes de cada componente extraído que foram calculados através de regressões e salvos como variáveis compostas. Significância, correlações não ajustadas estão destacados em negrito; os valores absolutos de r>0.45 permanecem significativos em P de 0.05, e valores absolutos de r>0.64 permanecem significativos em P de 0.01. Correlações significativas depois da múltipla correção sequencial de Bonferroni, testes simultâneos dentro de sub-tabelas (Rice, 1989), estão indicadas por um asterisco.

Anexo 1. Morfologias e morfometrias usadas na identificação dos parasitas encontrados em *Rhinella icterica*. (A) *Oswaldocruzia subauricularis*; (B) *Rhabdias* sp.; (C) *Physaloptera* sp.; (D) *Falcaustra máscula*; (E) Cosmocercidae; (F) *Acanthocephalus saopaulensis* e (G) *Mesocoelium monas*.

Tabela A. Morfologias e morfometrias usadas na identificação de *Oswaldocruzia subauricularis* (N=24)

Variáveis	Média±Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Fêmea			
Comprimento total (µm)	14610.44±4880.66	5564.11	22888
Largura total (µm)	219.10±62.80	130.79	364.16
Dilatação cefálica (µm)	59.33±4.34	51.78	66.62
Comprimento esôfago (µm)	461.95±76.27	271.77	559.51
Distância asa cefálica-anterior (µm)	49.00±7.59	34.58	72.67
Distância poro excretor-anterior (µm)	510.64±54.21	388.81	587.4
Distância anel nervoso-anterior (µm)	273.88±14.02	265.65	290.07
Distância vulva-posterior (µm)	5090.07±2696.31	1901.97	13784
Distância cloaca-posterior (µm)	219.68±57.57	126.35	329.57
Comprimento ovo (µm)	85.27±9.32	49.00	128.00
Largura ovo (µm)	57.31±18.15	43.00	76.00
Macho			
Comprimento total (µm)	9400.42±1770.01	5973.53	11771.42
Largura total (µm)	163.73±46.92	96.68	256.49
Dilatação cefálica (µm)	51.17±7.63	32.98	59.26
Comprimento esôfago (µm)	414.38±107.07	121.49	548.74
Distância asa cefálica-anterior (µm)	44.81±4.65	36.5	51.93
Distância poro excretor-anterior (µm)	475.94±20.67	454.38	505.66
Distância anel nervoso-anterior (µm)	302.62±48.14	248.15	339.47
Comprimento espículo (µm)	234.65±16.78	201.93	263.85
Comprimento bolsa copulatória (µm)	350.27±131.28	169.61	581.46

Tabela B. Morfologias e morfometrias usadas na identificação de *Rhabdias* sp. (N=25)

Variáveis	Média±Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Comprimento total (µm)	12564.39±2472.64	75.07	729.90
Largura total (µm)	417.06±103.42	982.49	7887.00
Comprimento Esôfago (µm)	593.35±75.07	98.81	646.70
Distância vulva-posterior (µm)	6165.23±982.49	8.87	164.00
Distância cloaca-posterior (µm)	500.21±98.81	7.99	71.00
Comprimento ovo(µm)	100.36±7.14	72.00	120.00
Largura ovo(µm)	53.06±5.58	38.00	71.00

Tabela C. Morfologias e morfometrias usadas na identificação de *Physaloptera* sp. (N=2)

Variáveis	Média±Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Comprimento total (µm)	9747.01±6525.26	5132.96	14361.1
Largura total (µm)	293.82±43.70	262.92	324.72
Comprimento esôfago (µm)	261.80±26.14	243.32	280.29
Distância cloaca-posterior (µm)	150.16±60.51	107.37	192.95

Tabela D. Morfologias e morfometrias usadas na identificação de *Falcaustra ascula* (N=3)

Variáveis	Média±Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Comprimento total (µm)	4417.98±174.37	4222.38	4557.16
Largura total (µm)	207.90±51.44	167.02	265.67
Comprimento faringe (µm)	66.00±7.21	58.00	72.00
Largura faringe (µm)	35.00±10.39	29.00	47.00
Comprimento esôfago (µm)	376.66±11.05	364.00	384.00
Largura esôfago (µm)	37.33±8.32	28.00	44.00
Comprimento istmo (µm)	53.66±17.15	38.00	72.00
Largura istmo (µm)	52.00±12.16	44.00	66.00
Comprimento bulbo(µm)	108.33±21.22	91.00	132.00
Largura bulbo (µm)	108.00±4.00	104.00	112.00
Distância anel nervoso-anterior (µm)	233.52±0.24	233.35	233.69
Distância poro escretor-posterior (µm)	542.71	542.71	542.71
Distância vulva-posterior (µm)	2771.59	2771.59	2771.59
Distância cauda-posterior (µm)	258.59±80.94	204.72	351.68

Tabela E. Morfologias e morfometria usadas na identificação de *Cosmocercidae* (N=18)

Variáveis	Média±Desvio		Mínimo	Máximo
	Padrão			
Comprimento total (µm)	5467.37±878.49		3946.52	7231.58
Largura total (µm)	370.79±92.27		228.29	536.01
Comprimento faringe (µm)	57.40±7.22		44.60	70.54
Comprimento esôfago (µm)	658.36±40.13		590.22	735.59
Comprimento bulbo (µm)	136.00±17.70		109.00	168.00
Largura bulbo (µm)	150.44±18.31		106.00	178.00
Distância poro escretor-posterior (µm)	492.59±70.91		359.05	555.75
Distância anel nervoso-anterior (µm)	149.65±38.25		97.72	218.86
Distância cloaca-cauda (µm)	427.16±87.05		257.77	523.93
Distância vulva-posterior (µm)	2443.46±671.04		1265.98	3680.35
Comprimento ovo (µm)	66.09±12.02		41.00	90.00
Largura ovo (µm)	48.40±6.57		39.00	67.00

Tabela F. Morfologias e morfometrias usadas na identificação de *Acanthocephalus saopaulensis* (N=14).

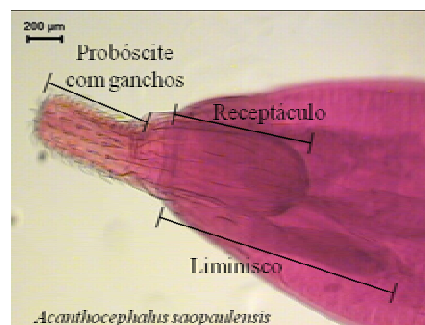
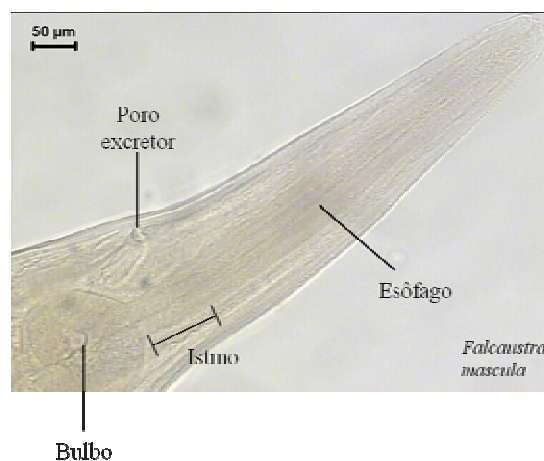
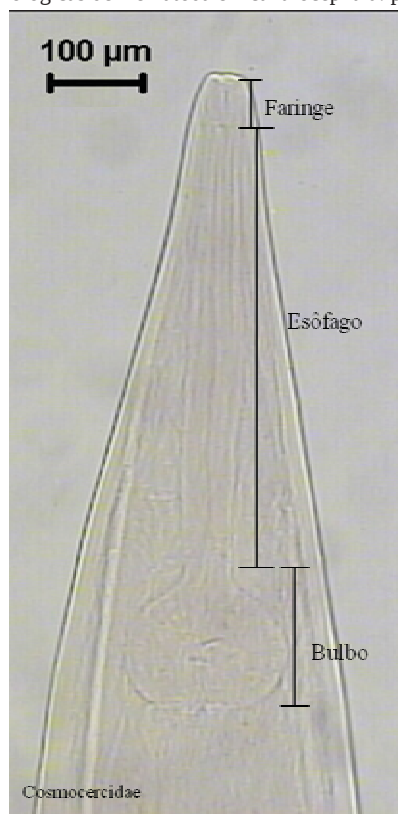
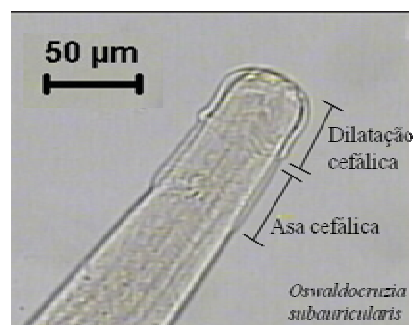
Variáveis	Média±Desvio		Mínimo	Máximo
	Padrão			
Comprimento total (µm)	13158.88±3556.08		6133	18341.8
Largura total (µm)	1138.33±361.24		558.31	1719
Comprimento probóscite (µm)	691.73±115.85		523.03	874.06
Largura probóscite (µm)	387.39±70.25		281.55	489.49
Nº de fileiras de ganchos na probóscite	6.10±0.87		5	8
Comprimento receptáculo (µm)	845.33±206.77		518.2	1251.8
Largura receptáculo (µm)	337.90±83.84		224.7	491
Comprimento liminisco (µm)	896.11±161.79		640.33	1030
Comprimento útero (µm)	1491.06±399.39		1061.51	1980
Comprimento ovo (µm)	60.71±13.78		39	100
Largura ovo (µm)	25.00±3.62		21	36
Comprimento testículo anterior (µm)	820.50±123.74		733	908
Largura testículo anterior (µm)	513.50±98.28		444	583
Comprimento testículo posterior (µm)	774.00±81.90		709	866
Largura testículo posterior (µm)	678.00±197.79		510	896

Tabela G. Morfologias e morfometrias usadas na identificação de *Mesocoelium monas* (N=3).

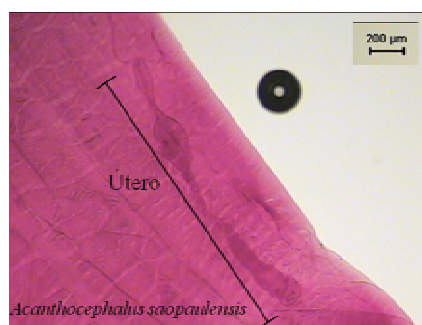
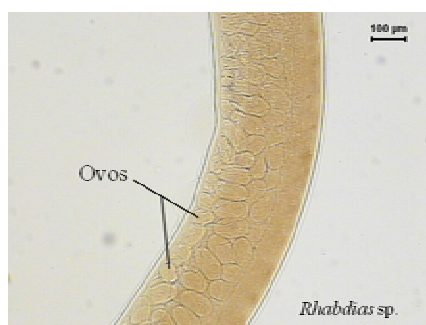
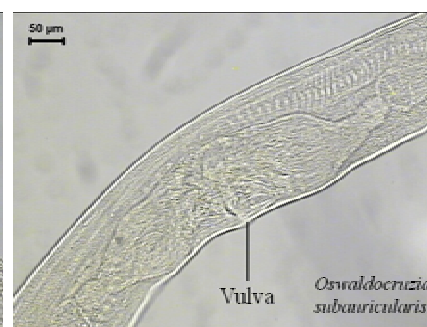
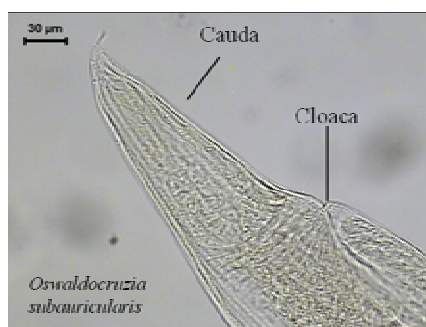
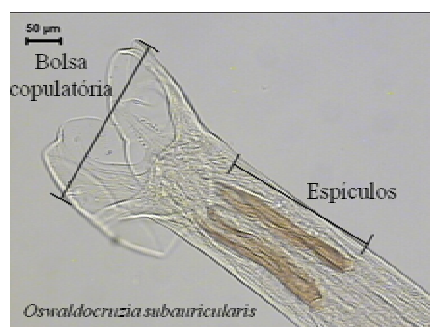
Variáveis	Média±Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
comprimento total (µm)	1054.88±461.99	728.20	1381.56
largura total (µm)	577.38±201.61	434.82	719.94
comprimento ventosa oral (µm)	283.46±258.34	102.20	579.27
largura ventosa oral (µm)	341.71±310.18	136.67	698.56
comprimento acetábulo (µm)	241.67±155.17	103.02	409.28
largura acetábulo (µm)	240.07±131.05	109.30	371.41
comprimento faringe (µm)	83.53±54.02	45.33	121.73
largura faringe (µm)	77.12±42.56	47.02	107.22
comprimento ovo (µm)	34.75±3.89	31.00	39.00
largura ovo (µm)	28.5±0.00	27.00	30.00
comprimento testículo (µm)	103.00	103.00	103.00
largura testículo (µm)	63.00	63.00	63.00
comprimento ovário (µm)	94.00	94.00	94.00
largura ovário (µm)	61.00	61.00	61.00

Anexo 2. Exemplos de estruturas morfológicas usadas na identificação das espécies do grupo Nematoda e Acanthocephala, encontradas em *Rhinella icterica*. (A) Partes anteriores do corpo e (B) partes posteriores do corpo.

A. Exemplos de estruturas morfológicas de Nematoda e Acanthocephala: partes anteriores do corpo.



B. Exemplos de estruturas morfológicas de Nematoda e Acanthocephala: partes posteriores do corpo.



Anexo 3: Certificado do comitê de ética do projeto: “Correlações comportamentais, fisiológicas e morfológicas da carga parasitária em *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae).”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **169-CEEA**, sobre “CORRELAÇÕES COMPORTAMENTAIS, FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DA CARGA PARASITÁRIA EM *Rhinella icterica* (ANURA: *Bufonidae*)”, sob a responsabilidade de **Fernando Ribeiro Gomes e Eduardo Hermogenes Moretti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de **04/09/2009**.

Botucatu, 4 de setembro de 2009.


Profa. Dra. PATRÍCIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO
Presidente - CEEA