

## Capítulo 3

A relação entre estresse e parasitos: a coloração pode ser um indicativo de maior resistência aos efeitos do estresse?

Victor Aguiar de Souza Penha<sup>1</sup>, Lilian Tonelli Manica<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ecologia Comportamental e Ornitologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

### INTRODUÇÃO

A coloração da plumagem é essencial para a sinalização em aves, fornecendo informações relevantes sobre a condição física dos indivíduos (Hill, 2006). Fêmeas utilizam colorações mais elaboradas para escolher parceiros sexuais, já que esses ornamentos são sinais honestos das qualidades do macho (Andersson, 1994). Em consequência disso, a coloração da plumagem de aves tem sido um campo pesquisado para estudos relacionados a seleção sexual em aves (Hill, 2006). Kodric-Brown (1985) estudando a preferência de fêmeas de *Poecilia reticulata*, encontrou que fêmeas discriminavam diferentes variações de colorações e que preferiam machos com variações de coloração mais semelhantes à de fêmeas. Esses resultados estão em concordância com a hipótese da seleção sexual, em que machos com determinadas condições de coloração da plumagem são selecionados por fêmeas. Colorações de plumagem em aves podem ser formadas por diferentes mecanismos, podendo ser tanto devido a microestrutura da pena quanto por pigmentos depositados na plumagem durante o desenvolvimento da pena (Fox, 1976). Pigmentos em plumagens podem ser gerados principalmente por dois componentes, a melanina e os carotenoides (Hung & Li, 2015). A melanina tem sido relacionada a uma maior agressividade, maior atração sexual e maior resistência ao estresse em indivíduos mais saturados (Ducrest et al., 2008). Vertebrados produzem melaninas através de aminoácidos, principalmente fenilalanina e tirosina (Hill & McGraw, 2006). Já os carotenoides são provenientes da dieta (Brush 1990) e além de fornecerem colorações em plumagens de aves, são também estimuladores do sistema imune e são utilizados como reserva energética (Hill, 1999). Além de ser importante para a seleção sexual, indivíduos mais ornamentados, seja por carotenoides ou por melaninas, podem sinalizar uma maior habilidade em lidar com situações de estresse (Sapolsky et al., 2000). Henschen et al. (2018), estudando a

relação entre ornamentação e plumagens de aves e uma resposta aguda ao estresse em *Geothlypis trichas*, encontraram que machos com mais saturação na plumagem tinham uma resposta maior ao estresse, produzindo mais corticosterona.

Corticosterona (CORT) é o principal hormônio glicocorticoide de estresse produzido em aves e é coordenado pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) do sistema endócrino (Sapolsky et al., 2000). A secreção de CORT desencadeia uma sequência de mudanças comportamentais e fisiológicas que estão relacionados com a sobrevivência dos indivíduos (Blas et al., 2007). A liberação de CORT acontece, principalmente em momentos de estresse, como a variação na temperatura, redução alimentar, interações sociais agonísticas, distúrbios antrópicos, presença de predadores e até infecções por parasitos (Vleck et al., 2000). A produção e liberação de CORT juntamente com os processos relacionados à deposição de melanina na plumagem de aves são influenciados por processos fisiológicos no organismo de aves (Moore et al., 2016). A melanina é produzida quando o hormônio estimulador de alfa melanócito ( $\alpha$ -MSH) se liga ao receptor de melanocortina do tipo 1. No entanto, o  $\alpha$ -MSH também pode se ligar ao receptor de melanocortina do tipo 4, que inibe a produção de corticosterona em aves (Ducrest et al., 2008). A partir dessa interação, deve haver uma associação negativa entre o estresse induzido pela CORT e a coloração baseada em melanina, já que indivíduos devem ter maiores níveis de  $\alpha$ -MSH durante o desenvolvimento da coloração (Constantini et al., 2011). No entanto, Lendvai & Chastel (2010) estudando a relação entre coloração por melanina e estresse induzido pela CORT, identificaram uma associação positiva entre a CORT produzida por indivíduos e a ornamentação baseada na coloração por melanina. Essa relação demonstra que indivíduos com maior ornamentação por melanina devem lidar melhor com situações de estresse, associados com altos níveis de CORT. Já o carotenoide, que é utilizado tanto para coloração de plumagem quanto como estimulador imunes tem sido associado tanto negativamente quanto positivamente com a concentração de CORT. Loiseau et al. (2008) estudando a relação entre CORT e pigmentação por carotenoides em plumagens de *Passer domesticus*, observaram que houve uma associação negativa, enquanto que Bortolotti et al. (2009), estudando a mesma relação em *Lagopus lagopus*, encontraram uma associação positiva. Essa relação estudada por esses trabalhos mostra que a relação entre CORT e a deposição de carotenoides na plumagem deve depender da espécie e

que mais estudos são necessários para elucidar tal questão. Outro importante fator que determina na relação entre a coloração de plumagem e a produção de hormônios que induzem estresse, é a infecção por parasitos (Hill, 2006).

Parasitos causadores de malária (Ordem Haemosporida, gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*) são parasitos transmitidos por vetores dípteros que replicam em tecidos de hospedeiros vertebrados, como em aves (Valkiunas, 2005). Parasitos causadores de malária tem parte do ciclo de vida em hospedeiros vertebrados acontecendo nos eritrócitos, que possuem hemoglobina, que serve como fonte de aminoácidos para os parasitos. A degradação da hemoglobina por parasitos faz com que espécies reativas de oxigênio sejam liberadas, gerando um desbalanço entre compostos oxidantes e antioxidantes no organismo de indivíduos infectados. Esse distúrbio no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é denominado de estresse oxidativo, o qual pode gerar peroxidação de membranas celulares, encurtamento de telômeros de cromossomos e aceleração do envelhecimento em indivíduos (Valkiunas, 2005). Van de Crommenacker et al. (2012), estudando a relação entre estresse oxidativo e parasitos causadores de malária em *Acrocephalus sechellensis*, encontraram que indivíduos parasitados foram associados com uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, durante períodos com alta demanda energética, como a reprodução. Além de parasitos, momentos de estresse, que liberem CORT no organismo, pode gerar estresse oxidativo, como a presença de predadores e o aumento de temperatura ambiental (Hill & McGraw, 2006). O principal mecanismo de resposta dos indivíduos é através do sistema de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, superóxido desmutase e a catalase (Milinkovic-Tur et al., 2007). Pamok et al. (2009), estudando a relação entre estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, em frangos de corte estressados com calor, encontraram que em indivíduos expostos a maiores temperaturas, houve um incremento na produção de malondialdeído, um importante componente do sistema antioxidante de aves.

O objetivo desse trabalho é estudar a relação entre estresse e a coloração por pigmentos em aves parasitadas e não parasitadas em *Chiroxiphia caudata* (Ordem Passeriformes, Família Pipridae), mais comumente conhecida como tangará. Esperamos que em indivíduos parasitados, aqueles que tenham plumagem com coloração mais chamativa (com maiores valores de saturação, matiz, brilho e volume de cor), tenham

maiores respostas ao estresse, produzindo mais corticosterona através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, mitigando os efeitos do estresse oxidativo, através de uma maior produção de enzimas associadas à eventos antioxidativos. Enquanto que, aqueles indivíduos com uma coloração de plumagem menos chamativa (menor saturação, matiz, brilho e volume de cor), produzam alta resposta ao estresse, com alta liberação de corticosterona, mas com um desbalanço maior causado pelo estresse oxidativo, produzindo menos enzimas associadas com eventos antioxidativos. Esperamos esse padrão, uma vez que a coloração de plumagem é um indicativo confiável de condição do organismo, e que indivíduos com coloração mais chamativa devem conseguir mitigar os efeitos do estresse oxidativo. Como também, esperamos que em indivíduos não parasitados, deve haver uma relação negativa entre a coloração de plumagem e concentração de hormônios relacionados ao estresse. Sendo assim, indivíduos com uma plumagem mais chamativa, devem ter uma menor produção de corticosterona, enquanto que indivíduos com plumagem menos chamativa, devem ter uma maior produção de corticosterona. Essa relação se deve ao fato de os indivíduos com coloração por melanina inibam diretamente a liberação de corticosterona, através da ligação de  $\alpha$ -MSH ao receptor de melanocortina do tipo 4, já que os indivíduos não estão parasitados. Enquanto que para a coloração de carotenoides, pode haver tanto uma relação positiva ou negativa entre a produção de corticosterona e a deposição de carotenoides na plumagem de aves, uma vez que os estudos demonstraram que há grande variação nas espécies estudadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### OBJETO DE ESTUDO:

*Chiroxiphia caudata* (Ordem Passeriformes: Família Pipridae) é uma espécie de aves que ocorre na região neotropical, majoritariamente, no sub-bosque e abaixo do dossel de regiões de floresta da América Central e do Sul (Ohlson et al., 2013). Há dimorfismo sexual na espécie, sendo que as fêmeas possuem uma plumagem esverdeada e os machos com plumagem definitiva possuem cabeça com penas de cor preta e com coroa alaranjada-avermelhada. A cobertura supra caudal tem traços de azul cerúleo e com penas caudais e de asa de coloração preta. O dorso e ventre dos machos tem coloração azulada (Mallet-Rodrigues & Dutra, 2012). A dieta é composta

basicamente de frutos. Durante o período reprodutivo, os indivíduos machos, desempenham danças antes da cópula em locais pré-definidos como arenas. Acredita-se que haja uma hierarquia entre machos dominantes e subordinados durante as danças para fêmeas (Francisco et al., 2007).

#### LOCAL DE AMOSTRAGEM:

O estudo será feito na reserva do Parque Estadual Pico Marumbi (48° 59' W 25° 29' S), comumente denominado de Mananciais da Serra com 80 hectares de tamanho, localizado especificamente no município de Piraquara, região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. A reserva está localizada à oeste da Serra do Mar paranaense, contendo uma vegetação composta basicamente por Florestas Ombrófilas do tipo Densa Montanha e Mista (Reginato & Goldenberg, 2007).

#### COLETA DE AMOSTRAS:

Os indivíduos serão capturados utilizando 5 redes de neblina com malha de 36 milímetros, com 12 metros de comprimento e 2.5 metros de altura. As redes serão abertas e a captura será conduzida entre as 5:00 da manhã até as 12:00 da tarde, durante 3 meses, em intervalos de 10 dias, de junho até agosto de 2019. Para cada indivíduo capturado, serão coletados os seguintes dados em triplicata: massa corporal, comprimento do tarso direito e comprimento da asa direita. Todos os indivíduos serão anilhados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/IBAMA). Será colhida duas pequenas amostras sanguíneas através de uma punção na veia braquial da asa esquerda e da asa direita. Sendo que o sangue proveniente da asa direita será armazenado em um microtúbulo contendo álcool absoluto, e o sangue proveniente da asa esquerda será armazenado em duplicata, um microtúbulo contendo EDTA e outro microtúbulo contendo tampão KLR. As amostras com EDTA e KLR serão colocadas em uma pequena caixa de isopor resfriada com cubos de gelo até centrifugação das amostras para análise de enzimas antioxidantes (ver próxima sessão para mais detalhes). Parte do sangue coletado será utilizado para fazer três esfregaços sanguíneos em uma lâmina, que será seca e fixada em campo, através da utilização de metanol, e corada em laboratório seguindo o protocolo descrito por Valkiunas (2005). Entre 5 ou 6 penas do peito serão coletadas de cada indivíduo e armazenadas em um microtúbulo identificado para análise do conteúdo de carotenoide. Será coletada também as décimas penas primárias de voo da

asa direita e esquerda para análise do conteúdo de hormônios glicocorticoides depositados nas penas. Após coleta dos dados, os indivíduos serão liberados no mesmo local que foram capturados.

#### DETECÇÃO DE HEMOPARASITOS POR MICROSCOPIA:

Através de um microscópio binocular com uma câmera acoplada, as lâminas com esfregaços sanguíneos serão analisadas em magnificação de 100 vezes. 100 campos por lâmina serão analisados, e em cada campo, serão registrados os seguintes dados: número de eritrócitos infectados por parasitos causadores de malária, eventuais parasitos sanguíneos e o número de leucócitos até a contagem de 100. A parasitemia será calculada através da contagem do número de eritrócitos infectados e não infectados fazendo uma proporção como se 10000 eritrócitos tivessem sido analisados, seguindo o protocolo de Valkiunas (2005).

#### ANÁLISE MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PARASITOS CAUSADORES DE MALÁRIA:

O DNA será extraído através do protocolo padrão de fenol-clorofórmio, para que seja feita uma reação em cadeia de polimerase (PCR) para rastrear amostras para a presença de *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus*. A reação utiliza, dentre outros componentes, o par de primers 343F e 496R, que amplifica uma região do genoma do parasito com 156 pares de bases (Fallon et al., 2003). Para todos os indivíduos que estejam infectados no ensaio com o par de primers 343f/496R, tentaremos amplificar um fragmento do gene do citocromo b da mitocôndria do parasito, usando primers aninhados, sendo que no ensaio mais abrangente o par de primer utilizado será o HaemNFI e o HaemNR3, e no ensaio menor abrangente serão os primers HaemF e HaemR2 (Waldenström et al., 2004). As amostras amplificadas serão purificadas com polietileno glicol 8000 e 20% de 2.5M de NaCl, e também sequenciados usando um sequenciador Sanger. As sequencias serão analisadas usando ChromasPro versão 2.6 e comparadas na base de dados MalAvi (Bensch et al., 2009).

#### ENSAIO DE CORTICOSTERONA NA PENA:

Antes das análises, as penas coletadas da asa esquerda e direita serão pesadas e terão o comprimento medido com a ajuda de um paquímetro. Após esse procedimento, o cálamo da pena será isolado e cortado à metade para que seja feita a extração da corticosterona. Primeiramente, o cálamo é cortado, com a ajuda de uma lâmina, em pequenos pedaços, com dimensões menores que 5 milímetros. 10 ml de metanol é

adicionado ao cálamo picotado e deixado em um banho-maria com sonicação em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o banho com sonicação, as amostras serão incubadas em 50°C por ao menos 12 horas, em um banho-maria com água corrente. O metanol então será separado por filtração à vácuo e os restos do cálamo serão novamente lavados com 2.5 ml de metanol, repetindo o mesmo procedimento por duas vezes. Após a segunda lavagem com 2.5 ml de metanol, as amostras serão secas ao ar livre. Após secagem, as amostras são adicionadas à um sistema tampão de fosfato e congeladas à -20°C até análise. A contagem de corticosterona será, então, feita através de um ensaio radio imunológico, seguindo o protocolo de (Bortolotti et al., 2008). A concentração final de corticosterona será em função do comprimento da pena, uma medida de correção para a quantidade medida.

#### ANÁLISE DOS PADRÕES COLORIMÉTRICOS DA PENA:

As penas serão posicionadas em um plano previamente testado, usado como um fundo preto, sem reflexões ultravioletas. Através da utilização de um espectrofotômetro portátil (USB4000; Ocean Optics) e do programa Spectrasuite 12.2 (Ocen Optics), iremos medir as reflectâncias das penas sobrepostas umas em relação as outras sob o fundo escuro. Somente comprimentos de onda entre 300 e 700 nanômetros serão considerados para gerar a curva de reflectância média para a espécie. Utilizaremos o pacote Pavo (Maia et al. 2013) do programa R (R core team, 2016). De acordo com a curva de reflectância, vamos extrair as seguintes variáveis: pico máximo de reflectância no ultravioleta e o croma do carotenoide. O croma do carotenoide pode ser calculado mediante a seguinte equação:

Equação 1:

$$\text{Croma do Carotenoide} = \frac{R_{700} - R_{450}}{R_{700}}$$

Em que o R700 é o pico de reflectância máximo no ponto de 700 nanômetros e R450 é o pico máximo de reflectância no ponto de 450 nanômetros. O croma do carotenoide é um indicativo da concentração de carotenoide de cada indivíduo depositado nas penas (Hill & McGraw, 2006).

Como o sistema visual de aves é tetra-cromático, há 4 células na retina que recebem diferentes fontes de comprimento de onda: curto (s), médio (m), longo (l) e ultravioleta (uv) (Hill & McGraw, 2006). Assim, utilizaremos um sistema visual

determinado para aves, seguindo o protocolo determinado por Vorobyev & Osorio (1998). A partir do modelo, as seguintes variáveis serão extraídas: saturação e matiz. A saturação utilizada foi a atingida, que representa o quanto de saturação um indivíduo tem em relação ao máximo de saturação possível, enquanto que a matiz é dividida em dois ângulos, o  $\theta$  e o  $\phi$ . Os ângulos nada mais representam do que a longitude e a latitude dos pontos dentro do sistema visual de aves, representado por um tetraedro (Vorobyev & Osorio, 1998).

#### ANÁLISE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E ÍNDICE HETEROFILOS/LINFÓCITOS:

A resposta ao estresse oxidativo será calculada mediante três métodos: índice heterofilos/linfócitos, concentração de duas enzimas e através do ensaio KRL. Primeiramente, a atividade das enzimas será medida separadamente, da glutathione peroxidase e do malondialdeído. A glutathione peroxidase será medida através do sangue armazenado com EDTA. Essa amostra será diluída em 50  $\mu$ l de salina isotônica e 400  $\mu$ l de água duplamente destilada. Após a mistura, a amostra será armazenada em  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos para hemólise das hemácias. 0.5 ml de reagente de Drabkings será misturado e colocado em um reagente tampão, que contem a enzima glutathione reduzida e a glutathione redutase. O ensaio consiste em pegar 0.1 ml da mistura e colocar com 2.8 ml do tampão em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, a atividade da glutathione peroxidase é medida seguindo o protocolo de Pamok et al. (2009). Já a atividade do malondialdeído será medido através do conteúdo de ácido tiobarbitúrico reativo à malondialdeído, seguindo o mesmo protocolo e a partir da mesma amostra.

As amostras armazenadas com o tampão KRL serão utilizadas para fazer um ensaio KRL. O ensaio KRL adaptado a aves mede a resistência ao estresse oxidativo como o tempo em que leva para 50% dos eritrócitos de uma amostra à hemólise após exposição à iniciadores de radicais livres. Essa análise será feita seguindo o protocolo de Henschen et al. (2018). Por fim, o índice heterofilo e linfócitos será feito a partir dos esfregaços de lâminas feitos em campo, e também utilizados para identificação da presença de parasitos. O método consiste na contagem em microscópico com magnificação de 100 vezes do número de leucócitos, até chegar em 100 unidades. Serão contados os números de basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e heterofilos. Após esse procedimento, será dividido o número de heterofilos pelo numero de linfócitos,

para a determinação do índice de estresse, seguindo o protocolo descrito por Butler et al. (2010).

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Serão feitos dois modelos separados, o primeiro entre indivíduo parasitados e não parasitados, e o segundo somente com indivíduos parasitados. No primeiro modelo, faremos um modelo linear generalizado (GLM), com a variável resposta como a presença ou ausência de parasitos, e as variáveis explicativas como as variáveis colorimétricas (croma de carotenoide, pico de reflectância máximo no ultravioleta, saturação e os dois ângulos da matiz) e a quantidade de corticosterona em função do comprimento da pena. Com esse teste, queremos testar, se indivíduos não parasitados, que não estejam sofrendo estresse por parasitos, tenha maiores índices de variáveis colorimétricas e menores concentrações de corticosterona na pena. Já no segundo teste, utilizando somente indivíduos parasitados, queremos testar, se indivíduos com maiores índices de variáveis colorimétricas (croma de carotenoide, pico de reflectância máximo no ultravioleta, saturação e os dois ângulos da matiz) são bons preditores para a resposta do sistema antioxidante. Para tal, faremos outro GLM com a concentração das enzimas glutathione peroxidase, malondialdeído, tempo gasto para a hemólise de 50% dos eritrócitos, para testar são explicados pelas variáveis de coloração. Em modelos separados, mediremos as variáveis antioxidantes como variáveis respostas, e como explicativas as variáveis de coloração e a concentração de corticosterona na pena. Todas as análises serão feitas pelo pacote lme4 no programa R (R core team, 2016).

#### REFERÊNCIAS

- Andersson, M. B. Sexual selection. Princeton, NJ: Princeton, University Press, 1994.
- Bensch., S.; Hellgren, O.; Pérez-Triz, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 1353 – 1358, 2009.
- Blas, J.; Bortolotti, G. R.; Tella, J. L.; Baos, R.; Marchant, T. A. Stress response during development predicts fitness in a wild, long-lived bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, p. 8880 – 8884, 2007.

Bortolotti, G. R.; Marchant, T. A.; Blas, J.; Cabezas, S. Tracking stress: localization, deposition and stability of corticosterone in feathers. *Journal of Experimental Biology*, v. 212, p. 1477 – 1482, 2009.

Bortolotti, G. R.; Marchant, T. A.; Blas, J.; German, T. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology* v. 22, p. 494 – 500, 2008.

Brush, A. H. Metabolism of carotenoids in birds. *FASEB*, v. 4, p. 2969 – 2977, 1990.

Butler, M. W.; Leppert, L. L.; Dufty Jr, A. M. Effects of small increase in corticosterone levels on morphology, immune function and feather development. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2010.

Costantini, D.; Marasco, V.; Møller, A. P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, v. 181, p. 447 – 456, 2011.

Ducrest, A. L.; Keller, L.; Roulin, A. Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 23, p. 502- 510, 2008.

editors. *Bird Coloration*. Cambridge: Harvard University Press; 2006.

Fallon, A. S. M.; Ricklefs, R. E.; Swanson, B. L.; Bermingham, E. Detecting Avian Malaria : an Improved Polymerase Chain Reaction Diagnostic. *Detecting Avian Malaria : an Improved Polymerase Chain*. 89:1044–1047, 2003.

Fox, D. L. *Animal Biochromes and structural colors*. Berkeley: University of California Press.

Francisco, M. R.; Gibbs, H. L.; Galetti, M.; Lunardi, V. O.; Galetti-Junior, P. M. Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 4908 – 4918, 2007.

Henschen, A. E.; Whittingham, L. A.; Dun, P. O. Male stress response is related to ornamentation but not resistance to oxidative stress in a warbler. *Functional Ecology*, v. 32, p. 1910 – 1918, 2018.

Hill, G. E. Female mate choice for ornamental coloration. In: Hill, G. E.; McGraw, K. J., Hill, G. E. Is there an immunological cost to carotenoid-based ornamental coloration? *American Naturalist*, v. 154, p. 589 – 595, 1999.

Hill, G.; McGraw, K. *Bird Coloration I: mechanisms and measurements*. Cambridge: Harvard University Press; 2006.

Hung, H. Y.; Li, S. H. Brightness of melanin-based plumage coloration is a cue to oxidative stress in Himalayan Black Bulbuls (*Hypsipetes leucocephalus nigerrimus*). *Avian Research*, v. 6, 2015.

Kodric-Brown, A. Female preference and sexual selection for male coloration in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 17, 199 – 205, 1985.

Lendvai, A. Z.; Chastel, O. Natural variation in stress response is related to post-stress parental effort in male house sparrows. *Hormones and Behavior*, v. 58, p. 936 – 942, 2010.

Loiseau, C.; Fellous, S.; Haussy, C.; Chastel, O.; Sorci, G. Condition-dependent effects of corticosterone on a carotenoid-based begging signal in house sparrows. *Hormones and Behavior*, v. 53, p. 266 - 273, 2008.

Maia, R.; Eliason, C. M.; Bitton, P. P.; Doucet, S. M.; Shawkey, M. D. Pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 10, p. 609 – 613, 2013.

Mallet-Rodrigues, F.; Dutra, R. Acquisition of definitive adult plumage in male Blue Manakins *Chiroxiphia caudata*. *Cotinga*, v. 34, p. 24 – 27, 2012.

Milinkovic-Tur, S.; Stojevic, Z.; Pirsljin, J.; Zdelar-Tuk, M.; Poljicak-Milas, N.; Ljubic, B. B.; Gradinski-Vrbanac, B. Effect of fasting and refeeding on the antioxidant system in cockerels and pullets. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 55, p. 181 - 189, 2007.

Moore, F. R.; Shuker, D. M.; Dougherty, L. Stress and sexual signaling: A systematic review and meta-analysis. *Behavioral Ecology*, v. 27, p. 363 – 371, 2016.

Ohlson, J. I.; Fjeldsa, J.; Ericson, P. G. P. Molecular phylogeny of the manakins (Aves: Passeriformes: Pipridae), with a new classification and the description of a new genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 69, p. 796 – 804, 2013.

Pamok, S.; Aengwanich, W.; Komutrin, T. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, v. 34, p. 353 – 357, 2009.

Pamok, S.; Aengwanich, W.; Komutrin, T. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, v. 34, p. 353 – 357, 2009.

R core team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Reginato, M.; Goldenberg, R. Análise florística, estrutural e fitogeográfica da vegetação em região de transição entre as florestas ombrófilas mistas e densa montana, Piraquara, Paraná, Brasil. *Hoehnea*, v. 34, p. 349 – 364, 2007.

Sapolsky, R. M.; Romero, L. M.; Munck, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21, p. 55 – 89, 2000.

Valkiunas, G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporida. CRC Press, New York, 2005.

Vleck, C. M.; Vortalino, N.; Vleck, D.; Bucher, T. L. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living adélie penguins. *The Condor*, v. 102, p. 392 – 400, 2000.

Vorobyev, M.; Osorio, D. Receptor noise as a determinant of color threshold. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v. 265, p. 251 – 358, 1998.

Waldenström, J.; Bensch, S.; Hasselquist, D.; Ostamn, O. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemorphotus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology*, v. 90, p. 191 – 194, 2004.