



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

## **Consequências do cativeiro para a reprodução de um Passeriforme Neotropical**



Julia Borges Feliciano de Lima

Orientadora: Dra. Regina Helena Ferraz Macedo

Brasília, Distrito Federal

2017

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Julia Borges Feliciano de Lima

## **Consequências do cativeiro para a reprodução de um Passeriforme Neotropical**

Orientadora: Dra. Regina Helena Ferraz Macedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Brasília, Distrito Federal

2017

## **Agradecimentos**

Agradeço imensamente ao Universo por todas as oportunidades, por todas as bênçãos e por ter colocado no meu caminho as melhores pessoas do mundo. À minha mãe, obrigada por ter dedicado toda a sua vida a mim e aos meus irmãos. Ao meu pai, obrigada por ter sido o meu suporte e o meu “porto-seguro” pra que eu conseguisse fazer esse Mestrado. À minha irmã, obrigada por ter sido e estar se tornando cada vez mais uma companheira de vida essencial pra mim. E ao meu avô Luiz Paulo, obrigada por ser a minha maior fonte de inspiração e exemplo de vida.

À minha orientadora e grande inspiradora, Regina Macedo. Muito obrigada por tudo desde o início, desde quando eu me encantei por Comportamento Animal cursando as suas disciplinas na Graduação. Muito obrigada por todo o suporte, por acreditar em mim (às vezes mais do que eu mesma acredito), por toda a ajuda e por todo o incentivo. Você é uma pessoa maravilhosa e eu não poderia ter escolhido alguém melhor pra ser minha orientadora.

Ao Felipe Pena, obrigada por ser um super parceiro! Obrigada por ter me acompanhado durante todo esse processo, por ter tido paciência nos momentos difíceis, por ter compartilhado comigo todas as alegrias e por ter me ajudado tantas vezes em campo e na manutenção do aviário. Muito obrigada! À minha família de coração: Elba, Samia e Thiago. Sou infinitamente grata ao Universo por ter colocado vocês na minha vida! Sem vocês eu não teria conseguido, de verdade. Muito obrigada por todas as conversas, por todos os conhecimentos construídos juntos e por todo o apoio e ajuda pra que eu concluísse esse Mestrado com um pouquinho de sanidade mental. À Thaís, minha irmã do coração, que me acompanha em tudo desde sempre e pra sempre. À minha amiga-irmã recém encontrada, Isabel Santos, muito obrigada por ter surgido na minha vida. Você foi essencial pra que eu conseguisse realizar a parte deste trabalho em Madrid. Obrigada! Eu amo muito vocês!

Às minhas estagiárias e amigas, Flávia, Caren e Camila. MUITO OBRIGADA! A participação de vocês foi essencial pra que tudo isso acontecesse e eu, definitivamente, não teria feito nada disso sem vocês. Aos meus amigos do laboratório de Comportamento Animal por toda as experiências e conhecimentos compartilhados. Em especial, ao Pedro Diniz, muito obrigada por toda a ajuda com o desenvolvimento e conclusão do projeto, e muito obrigada também por ser um grande exemplo de pessoa e de pesquisador.

Ao Dr. Diego Gil, à Dra. Lucía Arregui e toda a equipe do laboratório de *Ecofisiología* pelo apoio para a realização dos ensaios hormonais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e à Universidade de Brasília, pela oportunidade de desenvolver esse projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado. À FAP-DF pelo auxílio financeiro concedido para a visita técnica ao *Museo Nacional de Ciencias Naturales*.

À Dra. Maria Alice dos Santos Alves, ao Dr. Ricardo Machado e à Dra. Ludmilla Aguiar por aceitarem participar da minha banca.

## Resumo

A manutenção de animais em cativeiro tem grande importância para conservação e pesquisa. Entretanto, animais cativos frequentemente apresentam alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que podem levar à supressão da reprodução. Tais alterações podem ser motivadas pela indisponibilidade de indicativos associados às variações ambientais sazonais e pelo desenvolvimento de quadros de estresse crônico. Portanto, esse trabalho teve como objetivo investigar o potencial efeito do cativeiro sobre parâmetros relacionados à reprodução em indivíduos de *Volatinia jacarina*. Foram mensurados parâmetros fisiológicos e morfológicos (testosterona, estradiol, progesterona, relação heterófilo/linfócito, hematócrito, condição corporal e, em machos, cobertura corporal por plumagem nupcial), os quais foram comparados entre um grupo de indivíduos cativos e um grupo de indivíduos selvagens. Todos os parâmetros analisados, exceto a variação temporal de condição corporal e de cobertura corporal por plumagem nupcial, apresentaram diferenças entre os grupos. Ao contrário do que era esperado, indivíduos selvagens apresentaram aumento dos níveis de estresse durante o período reprodutivo, enquanto indivíduos cativos permaneceram com os níveis de estresse constantes. Machos cativos apresentaram níveis constantes de testosterona, enquanto machos selvagens apresentaram redução dos níveis de testosterona ao longo do período reprodutivo. Fêmeas cativas sem placa de incubação apresentaram baixos níveis de estradiol, comparáveis aos observados em fêmeas selvagens em processo de cuidado parental. Os resultados obtidos sugerem que as alterações fisiológicas encontradas em indivíduos cativos resultam da ausência ou alteração de condições ambientais necessárias para a regulação da reprodução, principalmente para as fêmeas. Uma possível solução para minimizar os efeitos do cativeiro seria a tentativa de simular, no cativeiro, as condições naturais para as quais cada espécie é adaptada. Uma melhor compreensão dos efeitos do cativeiro é essencial para o

aprimoramento de programas de conservação que se baseiam na manutenção de animais cativos e também para o desenvolvimento de pesquisas científicas confiáveis que utilizam animais cativos.

**Palavras-chave:** reprodução; cativeiro; hormônios reprodutivos; estresse.

## **Abstract**

The maintenance of captive animals is of great importance for conservation and scientific purposes. However, captive animals frequently exhibit changes in morphological, physiological and behavioral traits that frequently lead to suppression of breeding. These changes can occur due to the absence of cues related to natural seasonal variations and also due to the development of chronic stress. Therefore, the objective of this study was to investigate the potential effects of captivity upon breeding parameters in the blue-black grassquit (*Volatinia jacarina*). Several parameters (testosterone, estradiol, progesterone, heterophil/lymphocyte ratio, hematocrit, body condition and, in males, nuptial plumage coverage) were measured and compared between a captive and a wild group. All the parameters analyzed, except for temporal variation in body condition and nuptial plumage coverage, differed between the two groups. Contrary to expectations, wild individuals exhibited an elevation in stress level as the breeding period progressed, while captive individuals maintained constant levels of stress through the breeding period. Captive males had constant levels of testosterone, while wild males exhibited decreased levels through time. Captive females without a brood patch had very low levels of estradiol, comparable to those observed in wild females involved with parental care. The results of this study suggest that the physiological differences between captive and wild individuals are probably due to the absence of or changes in environmental conditions essential to the regulation of breeding, especially for females. A possible solution to minimize the effects of captivity is the simulation of the natural conditions to which each species is adapted. A better understanding of the effects of captivity upon animals is essential for the improvement of conservation breeding programs and for the development of reliable scientific research using captive animals.

**Keywords:** breeding; captivity; breeding hormones; stress.

## Sumário

1. Introdução.....	9
1.1 Objetivo e hipótese geral .....	15
2. Material e Métodos.....	16
2.1 Cronograma de amostragem e procedimentos gerais .....	16
2.2 Indivíduos selvagens.....	17
2.3 Indivíduos de cativeiro .....	17
2.4 Coleta de sangue.....	18
2.5 Hematócrito e condição corporal.....	19
2.6 Estresse – relação heterófilo/linfócito .....	20
2.7 Ensaio hormonal.....	20
2.8 Cobertura corporal por plumagem nupcial.....	22
2.9 Análises estatísticas .....	23
2.10 Comissão de ética .....	24
3. Resultados.....	24
3.1 Hematócrito e condição corporal.....	24
3.2 Estresse – relação heterófilo/linfócito .....	27
3.3 Hormônios reprodutivos .....	28
3.4 Cobertura corporal por plumagem nupcial.....	31
3.5 Tempo de permanência em cativeiro.....	31
4. Discussão .....	32
5. Referências Bibliográficas.....	39



## 1. Introdução

A manutenção de animais em cativeiro tem sido de grande importância para a conservação de espécies ameaçadas de extinção e também para o desenvolvimento de pesquisas científicas (Dickens et al., 2009, Dickens e Bentley, 2014). Entretanto, são observadas alterações em padrões morfológicos, fisiológicos e comportamentais dos animais em resposta ao cativeiro (Calisi e Bentley, 2009; Lattin *et al.*, 2016), o que frequentemente gera desregulação ou até mesmo supressão de processos fisiológicos de história de vida, como a reprodução (Bluhm *et al.*, 1983; Mason, 2010). Tais alterações podem ser um problema para programas de conservação que utilizam como ferramenta a manutenção de animais em cativeiro, além de gerar questionamentos relevantes sobre a possibilidade de extrapolação de dados científicos obtidos em cativeiro para as condições de animais selvagens (Warkentin e West, 1990; Larcombe e Withers, 2007; Calisi e Bentley, 2009; Hilmer *et al.*, 2010; Mason, 2010). Diversos fatores no contexto do cativeiro podem contribuir para as alterações observadas, como a indução de estado de estresse crônico (Morgan e Tromborg, 2007) e a supressão de indicativos de variações ambientais sazonais (Dickens e Bentley, 2014), necessárias para a regulação de atividades básicas de vida.

Os eventos de reprodução trazem consigo muitos custos e riscos. Por isso, é essencial que funções fisiológicas e comportamentos reprodutivos só sejam desencadeados sob condições onde há chances reais de sucesso reprodutivo (Adkins-Regan, 2005). Alguns aspectos ambientais agem como sinais, indicando que as condições estão propícias para a reprodução. Alguns indicadores ambientais de maior escala, como fotoperíodo, por exemplo, controlam aspectos que iniciam o processo reprodutivo e possibilitam que outros indicadores ambientais de menor escala (e.g., precipitação e disponibilidade de alimento) regulem a reprodução de maneira mais precisa e

específica (Wingfield *et al.*, 1992; Wingfield *et al.*, 2000). O fotoperíodo é tido como o principal fator que dá início aos processos ligados à reprodução (Dawson *et al.*, 2001; Small *et al.*, 2007), como o desenvolvimento inicial das gônadas e de características sexuais secundárias, como plumagens nupciais (Dawson *et al.*, 2001). Outros indicadores ambientais, como temperatura (Wingfield *et al.*, 2003), disponibilidade de alimento (Martin, 1987; Deviche e Sharp, 2001) e de água (Vleck e Priedkalns, 1985), aumento de biomassa verde (Priedkalns *et al.*, 1984) e a disponibilidade de sítios para nidificação (Wingfield *et al.*, 1992), atuam de forma mais precisa na regulação da reprodução, agindo como aceleradores ou inibidores das atividades reprodutivas (Wingfield *et al.*, 1992). Esses e outros fatores atuam em vias neuroendocrinológicas do controle da secreção de hormônios que vão atuar em diversos aspectos da reprodução (Small *et al.*, 2007), desde a produção de gametas até as fases finais de cuidado parental com a prole.

A testosterona é um hormônio esteroide gonadal que exerce funções essenciais na regulação da reprodução em machos. Esse hormônio atua no processo de produção e maturação de gametas masculinos, além de regular a expressão de caracteres sexuais secundários (Hau *et al.*, 2010), como ornamentos sexuais e comportamentos reprodutivos, que atuam como sinais para a atração de fêmeas (Desprat *et al.*, 2017). Segundo a hipótese do *handicap* em imunocompetência (*immunocompetence handicap hypothesis*; Folstad e Karter, 1992), sinais que indicam a qualidade do macho são mantidos pelo efeito dual da testosterona, que promove a expressão de sinais sexuais elaborados, mas tem o efeito de imunossupressão como consequência (Taff e Freeman-Gallant, 2014). Assim, machos de maior qualidade podem realizar mais investimentos em ornamentos sexuais, que são expressos de maneira dose-dependente em relação aos níveis de testosterona (Adkins-Regan, 2005). Características ornamentais de plumagem são tidas como ornamentos altamente confiáveis de qualidade do macho, devido aos altos custos para a sua produção (Hill *et*

*al.*, 1999). Diversos aspectos de plumagem de machos já foram relatados como dependentes de testosterona (Kimball e Ligon, 1999; Kraaijeveld *et al.*, 2007) e relacionados à fatores que, direta ou indiretamente, influenciam a reprodução, como o cuidado parental exercido pela fêmea à prole (Diniz *et al.*, 2015), contexto social dos indivíduos (Pereira, 2009; Lacava *et al.*, 2011), condição corporal (Doucet, 2002; Magalhães *et al.*, 2014) e carga parasitária (Magalhães *et al.*, 2014).

O cativeiro geralmente afeta mais as funções reprodutivas de fêmeas do que as de machos (Bluhm *et al.*, 1983). Para elas, a reprodução é regulada de maneira mais precisa, pois os custos são maiores do que para machos, desde a produção de gametas até as fases mais tardias de cuidado parental. Em comparação a gametas masculinos, a produção de gametas femininos é muito mais limitada e requer maiores investimentos energéticos. Por isso, é necessário que o desencadeamento de comportamentos reprodutivos só ocorra quando houver condições ambientais adequadas para a reprodução (Adkins-Regan, 2005), condições estas que podem ser alteradas ou suprimidas pela manutenção em cativeiro.

Os hormônios que estimulam os comportamentos reprodutivos das fêmeas são majoritariamente produzidos pelos folículos ovarianos maduros ou em processo de maturação (Adkins-Regan, 2005). Os principais hormônios esteroides gonadais que atuam na regulação de comportamentos reprodutivos em fêmeas são estrógenos (estradiol, principalmente) e progesterona, (Adkins-Regan, 2005). Em fêmeas de aves, o estradiol está relacionado à comportamentos reprodutivos que antecedem a postura de ovos, como a execução de comportamentos de corte, atração de parceiros, solicitação e receptividade para cópula (Wingfield e Farner, 1993; Williams, 1999; Leboucher *et al.*, 2000; Adkins-Regan, 2005; Bentley *et al.*, 2006). Em aves, a progesterona é associada ao comportamento de início de incubação de ovos (Askew, 1997), já tendo sido observado um aumento significativo da concentração sistêmica de

progesterona no dia anterior à postura do primeiro ovo (Sockman e Schawbl, 1999). Assim, a progesterona desempenha papel essencial na transição do período de corte e solicitação de cópula para o período de reclusão sexual e rejeição de cópula (Leboucher *et al.*, 2000). A secreção de ambos estradiol e progesterona frequentemente se mostra essencial para o desencadeamento apropriado dos comportamentos reprodutivos de fêmeas (Adkins-Regan, 2005).

Além dos hormônios esteroides sexuais, hormônios reguladores de estresse (glicocorticoides – predominantemente corticosterona, em aves) desempenham papel essencial na regulação da reprodução. Vertebrados que se reproduzem de forma sazonal apresentam as maiores concentrações periódicas de glicocorticoides durante os eventos reprodutivos, tanto em nível basal quanto após estímulos estressantes (Romero, 2002). É sugerido que o aumento dos níveis de glicocorticoides é regulado por variações ambientais sazonais, sendo que a manutenção de animais em cativeiro pode atuar na supressão de tais variações (Dickens e Bentley, 2014), desregulando a endocrinologia do estresse e podendo levar à supressão da reprodução. A resposta aguda à estímulos estressantes é um fator adaptativo (Sapolski *et al.*, 2000), pois a secreção em curto prazo de altas concentrações de glicocorticoides mobiliza funções fisiológicas a fim de garantir a sobrevivência, inibindo momentaneamente outras funções que não são necessárias para a sobrevivência em situações de risco, como a reprodução (Wingfield *et al.*, 1998). Entretanto, a contínua exposição à estímulos estressantes possibilita o desenvolvimento de estados de estresse crônico e possivelmente patológicos (Wingfield e Romero, 2001; McWeen, 2005). Alguns estudos mostram que o estado de estresse inicial gerado pela captura, manuseio e manutenção de aves em cativeiro começa a ser revertido cerca de dez dias após à chegada ao recinto (Dickens *et al.*, 2009). Assim, os efeitos de estresse crônico gerado pela manutenção em cativeiro devem ser avaliados após esse período inicial de adaptação.

Uma outra forma de se estimar os níveis de estresse crônico é por meio da relação heterófilo/linfócito, que é tida como uma forma mais confiável de mensuração de estresse em médio/longo prazo (Gross e Siegel, 1983; McFarlane e Curtis, 1989; Davis, 2005; Davis *et al.*, 2008), em comparação às medidas dos níveis plasmáticos de glicocorticoides. Em todos os táxons de vertebrados, estímulos estressantes têm como consequência o aumento do número de heterófilos e de neutrófilos e a redução do número de linfócitos circulantes no sangue (Davis *et al.*, 2008). Em répteis e aves, os neutrófilos são substituídos por heterófilos e exercem a mesma função imunológica (Jain, 1993). Assim, o aumento da razão heterófilo/linfócito (H/L) e neutrófilo/linfócito (N/L) é diretamente proporcional aos níveis de glicocorticoides secretados (Davis *et al.*, 2008).

Diversos estudos ecológicos e evolutivos buscam identificar parâmetros fenotípicos que resultam em variações de índices de sobrevivência e de sucesso reprodutivo (Bowers *et al.*, 2014), refletindo então a aptidão individual (*fitness*). Dois parâmetros frequentemente estudados em associação ao *fitness* são medidas de condição corporal e de hematócrito. Medidas de condição corporal geralmente visam quantificar as reservas energéticas de um indivíduo. Tais reservas, majoritariamente compostas por gorduras, são essenciais para o sucesso de eventos que necessitam de grande investimento energético, como a reprodução (Labocha e Hayes, 2012). Como revisado em Labocha e Hayes (2012), diversos estudos já relataram correlações entre condição corporal e parâmetros relacionados à reprodução, como sucesso reprodutivo (Chastel *et al.*, 1995; Wendeln e Becker, 1999; Robinson *et al.*, 2005), sobrevivência e longevidade de ninhegos (Tveraa *et al.*, 1998; Bowers *et al.*, 2014), abandono de ovos (Chastel *et al.*, 1995; Bustnes *et al.*, 2002; Bleeker *et al.*, 2005), probabilidade de múltiplas ninhadas (Tinbergen e Verhulst, 2000) e sucesso de nidificação (Wiebe e Martin, 1998). Hematócrito é definido como a quantidade relativa de células

vermelhas transportadoras de oxigênio (eritrócitos) em um volume total de sangue (Hõrak *et al.*, 1998) e é uma medida correlacionada ao *fitness* por refletir a capacidade de oxigenação de tecidos por um indivíduo (Ots *et al.*, 1998; Bowers *et al.*, 2014). Diversos estudos relatam correlações entre nível de hematócrito e parâmetros relacionados à reprodução, como condições ambientais do local de reprodução (Kilgas *et al.*, 2006), o fato de ser a primeira ou segunda ninhada de uma fêmea e data do início da postura de ovos (Norte *et al.*, 2010), longevidade de ninhegos (Bowers *et al.*, 2014), tamanho de ninhada (Hõrak *et al.*, 1998) e aspectos de cuidado parental (Navarro *et al.*, 2007). Assim, ambas as medidas, condição corporal e hematócrito, refletem em diferentes aspectos a condição fisiológica individual, que é essencial para que um evento tão custoso quanto a reprodução ocorra de maneira adequada e possa ser bem-sucedido.

O presente estudo visa avaliar o efeito do cativeiro sobre aspectos reprodutivos de aves e o tiziu (*Volatinia jacarina*, Linnaeus 1766, Aves: Thraupidae) é um modelo adequado para este estudo pois frequentemente, em cativeiro, esses animais apresentam supressão da reprodução e exibem comportamentos reprodutivos consideravelmente alterados em relação aos padrões observados em ambiente natural. O tiziu é um passeriforme neotropical com ocorrência registrada desde o México até o norte da Argentina e do Chile (Sick, 2001) e, na área do Brasil Central, o período reprodutivo da espécie se inicia quando as aves migram para a região, e ocorre entre os meses de novembro e abril (Carvalho *et al.*, 2007). *Volatinia jacarina* é uma espécie socialmente monogâmica, com altas taxas de paternidade extra-par (Manica *et al.*, 2016) e que exhibe cuidado bi-parental. Os machos participam da construção de ninhos e da provisão de alimentos para os ninhegos, mas o processo de incubação dos ovos é limitado às fêmeas (Almeida e Macedo, 2001; Carvalho *et al.*, 2007). Em ambiente selvagem, os machos passam por eventos de muda antes ou no início do período reprodutivo (Macedo *et al.*, 2012), substituindo a plumagem críptica de

coloração parda por uma plumagem nupcial iridescente negro-azulada com uma mancha branca subaxilar em cada asa (Sick, 2001). No final do período reprodutivo, os machos mudam novamente para uma plumagem de eclipse, que se assemelha à plumagem de fêmeas e juvenis (Sick, 2001). Em cativeiro, frequentemente machos permanecem com a plumagem iridescente negro-azulada e exibem display de corte durante todo o ano, e não somente durante o período reprodutivo. Quanto às fêmeas, poucas delas põem ovos e, as que põem, iniciam a postura de ovos no cativeiro em meados de agosto, enquanto em ambiente natural os primeiros ovos são postos no final de dezembro (Carvalho *et al.*, 2007). Nas condições de cativeiro do Aviário Científico do Laboratório de Comportamento Animal, parte dos ovos eclode e os filhotes que nascem vão a óbito cerca de quatro dias após a eclosão (Lima, J.B.F., observação pessoal).

### **1.1 Objetivo e hipótese geral**

Considerando que animais em cativeiro estão sujeitos à supressão de indicadores de certas variações sazonais naturais, como variações na disponibilidade de alimentos, por exemplo; e podem desenvolver quadros de estresse crônico, devido à exposição contínua a fatores estressantes, o objetivo deste trabalho é avaliar o possível efeito do cativeiro em parâmetros fisiológicos e morfológicos relacionados à reprodução em indivíduos de *V. jacarina*. Para isso, foram analisados, de forma comparativa, parâmetros de indivíduos de dois grupos, um cativo e um selvagem. A hipótese geral deste trabalho é de que indivíduos selvagens e cativos de *V. jacarina* apresentam diferenças em padrões de parâmetros fisiológicos e morfológicos relacionados à reprodução. Para testar essa hipótese, foram avaliados padrões de hormônios reprodutivos (testosterona, em machos, e estradiol e progesterona, em fêmeas) e outros parâmetros fisiológicos que têm efeito sobre a reprodução de animais (níveis de estresse, condição corporal e medidas de hematócrito), além da

cobertura corporal por plumagem nupcial em machos. Especificamente, espera-se encontrar maiores níveis de estresse em indivíduos cativos do que em indivíduos selvagens, devido ao fato de o cativeiro apresentar diversos fatores estressantes para os animais (Morgan e Tromborg, 2007). Adicionalmente, é esperado observar ao longo do período reprodutivo um declínio dos níveis de testosterona, em macho selvagens. Em relação aos hormônios reprodutivos femininos, espera-se encontrar diferentes concentrações plasmáticas de estradiol e de progesterona em função da presença ou da ausência de placa de incubação nas fêmeas. Espera-se observar maiores níveis de estradiol em fêmeas sem placa de incubação e maiores níveis de progesterona em fêmeas com placa de incubação.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Cronograma de amostragem e procedimentos gerais**

As amostragens foram realizadas mensalmente, em ambos os grupos cativo e selvagem (detalhamento abaixo), entre dezembro de 2016 e abril de 2017, período que abrange a estação reprodutiva de *V. jacarina* na área do Brasil Central (Carvalho *et al.*, 2007). Todos os animais foram submetidos à medições de parâmetros corporais e à coleta de sangue para análises hormonais e citológicas. Os animais foram capturados, pesados, medidos para tamanho de tarso, bico, asa e cauda; verificados para presença de placa de incubação e submetidos à coleta de sangue (detalhamento a seguir). Além dos procedimentos descritos, também foi feita uma estimativa de cobertura do corpo por plumagem nupcial iridescente negro azulada nos machos.



## 2.2 Indivíduos selvagens

Os indivíduos selvagens de *Volatinia jacarina* foram capturados para amostragem em uma área de Cerrado inserida em matriz urbana, localizada próxima à Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC), no Campus Darcy Ribeiro - Universidade de Brasília (15°46'S, 47°52'W). A área caracteriza-se como um fragmento de Cerrado alterado por ações antrópicas e é composto por fitofisionomias de Cerrado *stricto sensu* e de campo sujo, predominantemente dominado por *Brachiaria* sp.

Foram utilizadas dez redes de neblina instaladas em linhas contínuas e em diferentes pontos da área de estudo para capturar os animais. Após a captura, os animais foram amostrados, identificados com anilhas metálicas fornecidas pelo CEMAVE/ICMBio e posteriormente liberados no mesmo local de captura. No total, foram amostrados um total de 110 indivíduos selvagens de *V. jacarina* durante este estudo.

## 2.3 Indivíduos de cativeiro

A amostragem de animais cativos foi realizada a partir de um grupo de indivíduos de *V. jacarina* mantidos no Aviário Científico do Laboratório de Comportamento Animal, na Universidade de Brasília. Esse grupo era composto por 84 indivíduos, dos quais 79 foram amostrados, e os indivíduos diferiam entre si quanto ao tempo de permanência em cativeiro. Os indivíduos mais antigos estavam no cativeiro desde abril de 2008, enquanto os mais novos foram capturados em dezembro de 2016. O tempo mínimo entre captura e amostragem foi de quatro meses. Foram incluídas análises estatísticas para avaliar o possível efeito do tempo de permanência em cativeiro nos parâmetros avaliados. Para a amostragem, os indivíduos foram aleatoriamente

distribuídos durante os cinco meses de estudo, de forma que cada indivíduo fosse amostrado apenas uma vez, a fim de garantir a independência dos dados. Assim, foram amostrados cerca de oito fêmeas e oito machos cativos em cada mês, durante todo o estudo.

Os animais cativos eram identificados por combinações individuais de anilhas coloridas e estavam distribuídos em três recintos, que mediam 4m<sup>2</sup>, cada um, e continham o mesmo número de machos e de fêmeas, visando simular a provável razão sexual da população da espécie em ambientes naturais. Os recintos ficavam ao ar livre em um regime semi-natural, onde os animais eram expostos à algumas condições ambientais naturais, como fotoperíodo, temperatura e umidade relativa. Os animais foram alimentados com uma mistura de grãos (alpiste, painço e níger) e ração Nutrópica para passeriformes granívoros de pequeno porte, que era ofertada juntamente com água *ad libitum*. A estrutura dos recintos era adaptada aos hábitos naturais da espécie, contendo itens como gramíneas, poleiros adequados, ninhos artificiais, pedras de cálcio e potes para banho. Água, alimento e os referidos itens de estrutura eram posicionados em vários pontos no interior do recinto, a fim de possibilitar o acesso de todos os indivíduos a esses itens.

#### **2.4 Coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada a partir da veia braquial dos animais. A perfuração foi realizada com agulha 13mm x 0,45mm (Solidor) e o sangue foi coletado com tubos capilares não-heparinizados (Perfecta). Os capilares foram fechados em uma das extremidades com massa de modelar e mantidos resfriados até a chegada ao laboratório. No laboratório, o sangue foi então centrifugado em microcentrífuga Evlab EV024 a 11500rpm por cinco minutos, para separação do plasma. Foram tomadas medidas de hematócrito (detalhamento abaixo) e o plasma obtido foi

armazenado em tubos tipo eppendorf 0,5ml, vedados com filme de parafina plástica (Parafilm M) e armazenados a -20°C até a realização das análises hormonais.

Uma gota de sangue foi utilizada para o preparo de lâminas de esfregaço, a partir das quais foi realizada estimativa da relação heterófilo/linfócito através de análises citológicas (detalhamento a seguir). As lâminas foram coradas com kit panótico rápido para coloração hematológica (NewProv) e armazenadas em temperatura ambiente para análises posteriores.

## **2.5 Hematócrito e condição corporal**

A medida de hematócrito foi obtida após o processo de centrifugação dos tubos capilares, descrito anteriormente nos procedimentos gerais, e foi definida como a quantidade relativa de células vermelhas (eritrócitos) no volume total de sangue, segundo Hõrak *et al.* (1998). Assim, as medidas de hematócrito foram obtidas por meio da razão do comprimento da porção de eritrócitos sobre o comprimento total do volume sanguíneo nos tubos capilares. Os comprimentos foram mensurados com paquímetro digital e o valor final de hematócrito individual foi definido como a média das medidas obtidas de três tubos capilares diferentes para cada indivíduo. A medida de condição corporal foi definida como a razão entre a massa corporal e o comprimento do tarso (Labocha e Hayes, 2012). A inspeção visual da distribuição dos dados em histogramas e gráficos do tipo boxplot (Ghasemi e Zahediasl, 2012) indicou que os dados de hematócrito e de condição corporal não possuíam distribuição normal. Assim, os dados foram transformados em logaritmo natural para atender à premissa de normalidade nas análises estatísticas.

## **2.6 Estresse – relação heterófilo/linfócito**

Os níveis de estresse foram estimados a partir da relação heterófilo/linfócito (H/L) (Gross e Siegel, 1983). As análises foram realizadas pela Dra. Glaucia Balsamão e sua equipe, no Laboratório Veterinário Santé, sediado em Brasília. Foram realizadas contagens das células imunológicas em questão (heterófilos e linfócitos), a partir das lâminas de esfregaço previamente coradas com kit panótico rápido para coloração hematológica (NewProv). As lâminas foram observadas em objetiva de imersão com aumento de 1000 vezes e a contagem de células foi feita por meio do método de contagem diferencial de leucócitos. A inspeção visual da distribuição dos dados em histograma e gráfico do tipo boxplot (Ghasemi e Zahediasl, 2012) indicou que os dados de relação H/L não possuíam distribuição normal. Assim, os dados foram transformados em logaritmo natural para atender à premissa de normalidade.

## **2.7 Ensaio hormonal**

As análises de testosterona, progesterona e estradiol foram realizadas no laboratório de *Ecofisiología*, no *Museo Nacional de Ciencias Naturales*, em Madrid, Espanha. Todos os ensaios foram supervisionados pela Dra. Lucía Arregui e realizados sob orientação do Dr. Diego Gil. A inspeção visual da distribuição dos dados em histogramas e gráficos do tipo boxplot (Ghasemi e Zahediasl, 2012) indicou que os dados de testosterona, progesterona e estradiol não possuíam distribuição normal. Assim, os dados foram transformados em logaritmo natural para atender à premissa de normalidade.

### 2.7.1 Testosterona e progesterona

As concentrações plasmáticas de testosterona e de progesterona foram mensuradas com a utilização de kits de enzimoimunoensaio (EIA) comerciais (Elisa Kit 582701 – testosterona e Elisa Kit 582601 – progesterona; Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Devido ao fato de *V. jacarina* ser uma ave de pequeno porte, com massa corporal de cerca de 10g, a coleta de sangue foi uma tarefa árdua e o volume de sangue coletado era bastante limitado. Assim, foi necessário realizar diluições das amostras obtidas, a fim de permitir que amostras com volume bastante reduzido fossem analisadas. Para isso, foram realizados ensaios preliminares com *pools* de amostras de machos, para os testes de testosterona, e de fêmeas, para os testes de progesterona, para determinar as diluições que seriam utilizadas. As diluições de 1:4 e 1:6, para testosterona e progesterona, respectivamente, apresentaram níveis de detectabilidade e de linearidade satisfatórios. Portanto, as amostras foram diluídas nessas proporções em solução tampão para teste ELISA, fornecida com o kit comercial utilizado. Os volumes reduzidos de plasma sanguíneo não permitiram análises em duplicatas. Assim, amostras de testosterona (n = 61) e de progesterona (n = 49) foram analisadas sem réplicas e os limites de detecção obtidos no presente estudo foram de 0,59pg/ml, para testosterona, e de 14,67pg/ml para progesterona.

### 2.7.2 Estradiol

Os ensaios preliminares para determinação da diluição que seria utilizada revelaram que as concentrações plasmáticas de estradiol eram muito baixas nas amostras analisadas, o que impossibilitaria a diluição das amostras em um volume que permitisse análises individuais. Assim, foram feitos *pools* com amostras de diferentes fêmeas divididas em quatro categorias: (i) fêmeas cativas com placa de incubação, (ii) fêmeas cativas sem placa de incubação, (iii) fêmeas selvagens com placa de incubação e (iv) fêmeas selvagens sem placa de incubação. Os *pools* foram

categorizados dessa forma a fim de analisar possíveis diferenças entre fêmeas livres e cativas, além de avaliar a relação entre presença ou ausência de placa de incubação e as concentrações plasmáticas de estradiol. A placa de incubação é presente em fêmeas que estão em processo de incubação de ovos e cuidado de ninhegos, portanto é esperado que as concentrações de estradiol sejam menores em fêmeas com placa de incubação.

As concentrações plasmáticas de estradiol foram então mensuradas com a utilização de um kit de enzimoimunoensaio (EIA) comercial (Elisa Kit 582251, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Foram utilizadas diluições que variaram entre 1:2 e 1:3. Esse intervalo de diluição apresentou níveis de detectabilidade e de linearidade satisfatórios nos testes preliminares, e as concentrações finais obtidas foram ajustadas em relação à diluição exata utilizada para cada amostra. O limite de detecção de estradiol no presente estudo foi de 1,98pg/ml.

## **2.8 Cobertura corporal por plumagem nupcial**

A cobertura corporal dos machos por plumagem nupcial iridescente negro azulada foi estimada com um disco transparente de acrílico de 1,4cm de diâmetro, dividido em oito partes iguais. Este disco foi posicionado em quatro regiões (cabeça, peito, dorso e região uropigiana) do corpo de cada indivíduo e foi verificado o número de partes do disco preenchidas por plumagem iridescente negro azulada. A estimativa de cobertura por plumagem nupcial foi definida como a média da razão do número de partes preenchidas por plumagem negro-azulada sobre o número total de partes do disco (oito), das quatro regiões do corpo de cada indivíduo. A inspeção visual da distribuição dos dados em histograma e gráfico do tipo boxplot (Ghasemi e Zahediasl, 2012) indicou que os dados de cobertura corporal por plumagem nupcial não possuíam distribuição

normal. Assim, os dados foram transformados em arco seno (asin) para atender à premissa de normalidade.

## **2.9 Análises estatísticas**

Preliminarmente, foram realizadas análises de correlação para definir quais variáveis seriam incluídas como explanatórias nos modelos de cada variável resposta analisada. Foram realizadas análises de correlação de Spearman, devido ao fato de muitas variáveis não possuírem distribuição normal, e as análises foram feitas separadamente para cada sexo. O critério para escolha de quais variáveis seriam utilizadas foi de a correlação ser significativa ( $p < 0.05$ ) ou apresentar tendência ( $0.05 < p < 0.10$ ).

Em seguida, foram realizados modelos lineares (GLM) para testar o efeito de tratamento, sexo e data no período reprodutivo em cada variável resposta analisada (hematócrito, condição corporal, relação H/L, testosterona, plumagem, progesterona e estradiol). Foi realizada seleção de modelos pelo método regressivo passo a passo, baseada em teste F (anova) entre modelos aninhados, iniciando com o modelo completo (tratamento\*sexo, tratamento\*dia). Foram inseridas como variáveis explanatórias em cada modelo aquelas variáveis que apresentaram correlação nos testes de correlação preliminares. Por exemplo, caso hematócrito e condição corporal apresentassem correlação, hematócrito entraria como variável explanatória no modelo linear de condição corporal, e vice e versa. As variáveis foram removidas uma a uma até que nenhuma pudesse ser removida sem perda de explicação pelo modelo ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, foram realizados testes de Tukey para analisar variáveis explanatórias categóricas e suas interações. Foi verificada multicolinearidade entre variáveis explanatórias através do comando vif e os resíduos dos modelos iniciais e finais foram analisados em relação à normalidade e homogeneidade das

variâncias. Todas as variáveis contínuas foram escalonadas antes das análises para geração de coeficientes padronizados. Seguindo o mesmo método, posteriormente também foi avaliado o efeito do tempo de permanência em cativeiro dos indivíduos em cada uma das variáveis analisadas. Todas as análises foram realizadas no programa R 3.2.4 (*The R Foundation for Statistical Computing* 2016).

## **2.10 Comissão de ética e autorizações**

Todos os procedimentos realizados com os animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, sob o número de processo 66709/2016. Todas as capturas e coletas foram autorizadas pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), sob número de processo 51757-1.

## **3. Resultados**

Os resultados da análise de correlação de Spearman mostraram que testosterona e razão H/L são negativamente correlacionadas ( $r_s = -0,32$ ,  $p = 0,02$ ,  $n = 53$ ), assim como progesterona e razão H/L são negativamente correlacionadas ( $r_s = -0,33$ ,  $p = 0,03$ ,  $n = 43$ ). Condição corporal e hematócrito apresentam tendência de correlação positiva em fêmeas ( $r_s = 0,29$ ,  $p = 0,056$ ,  $n = 43$ ). Portanto, somente essas variáveis foram incluídas como explanatórias nos modelos, além de tratamento, sexo e dia.

### **3.1 Hematócrito e condição corporal**

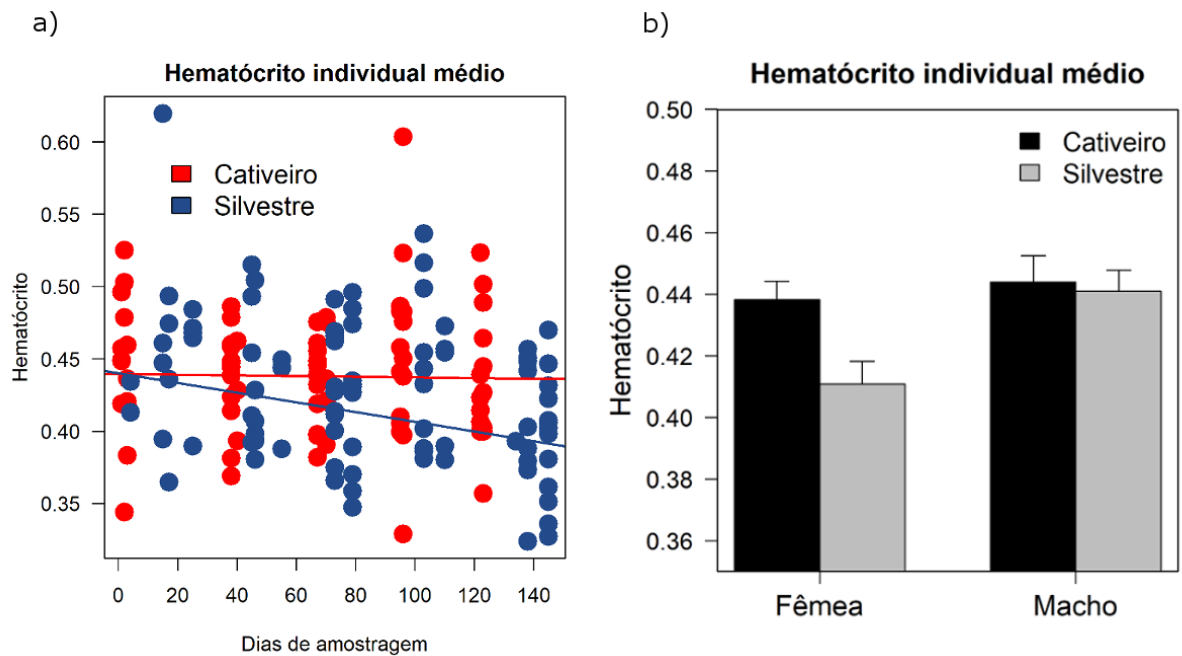
Hematócrito e condição corporal apresentaram correlação positiva nas análises de Spearman previamente realizadas; porém, nem hematócrito ( $F = 0,51$ ,  $df = 1,16$ ,  $p = 0,48$ ) e nem



condição corporal ( $F = 0,93$ ,  $df = 1,16$ ,  $p = 0,34$ ) permaneceram como variável explanatória nos modelos correspondentes.

### 3.1.1 Hematócrito

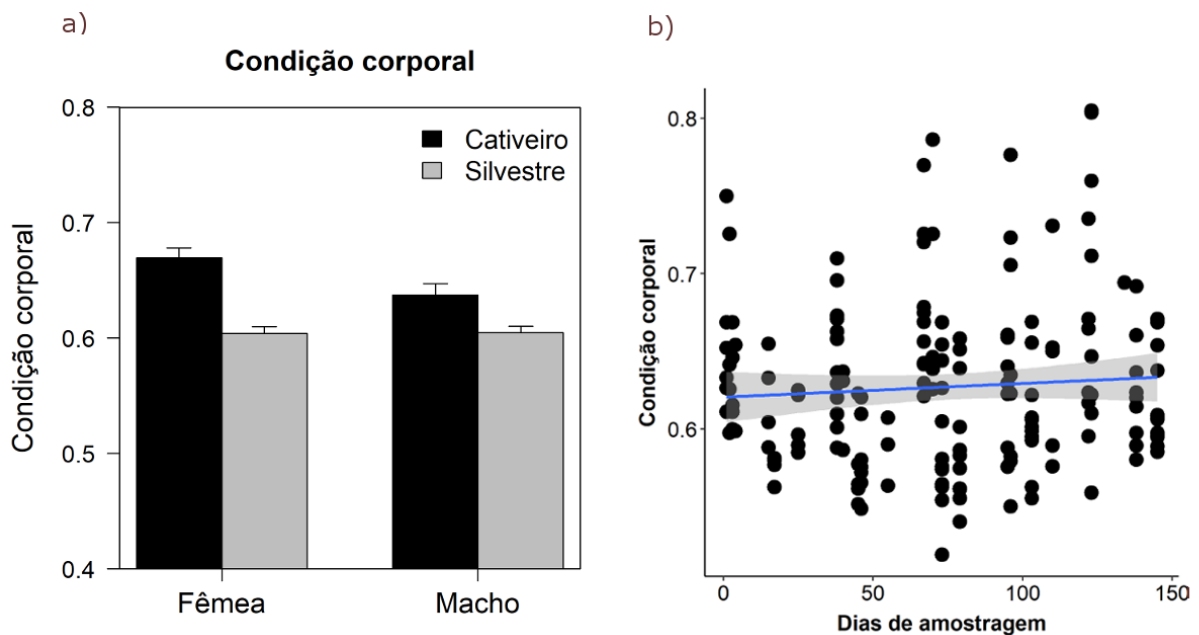
Em ambiente selvagem, o nível hematócrito tende a diminuir com o avanço do período reprodutivo ( $\beta = -0,28 \pm 0,15$ ,  $t = -1,85$ ,  $p = 0,066$ ), enquanto em cativeiro essa medida se manteve constante durante todo o tempo estudado ( $\beta = -0,03 \pm 0,11$ ,  $t = -0,25$ ,  $p = 0,80$ ). Fêmeas selvagens apresentam menores valores de hematócrito do que machos selvagens ( $\beta = -0,59 \pm 0,20$ ,  $t = -3,01$ ,  $p = 0,016$ ). Machos e fêmeas de cativeiro não apresentaram diferenças nos valores de hematócrito ( $\beta = -0,10 \pm 0,22$ ,  $t = -0,47$ ,  $p = 0,96$ ) (Figura 1).



**Figura 1. a)** Variação de hematócrito de indivíduos selvagens e cativos de *Volatinia jacarina* ao longo do período reprodutivo. O primeiro dia de amostragem corresponde ao dia 05/12/2016. Os pontos indicam amostras individuais e as linhas indicam os coeficientes de relação de cada tratamento. **b)** Média e intervalos de confiança dos valores de hematócrito de indivíduos de *V. jacarina* em função do sexo e tratamento (n=168, 85 machos e 83 fêmeas, 76 cativos e 92 selvagens).

### 3.1.2 Condição corporal

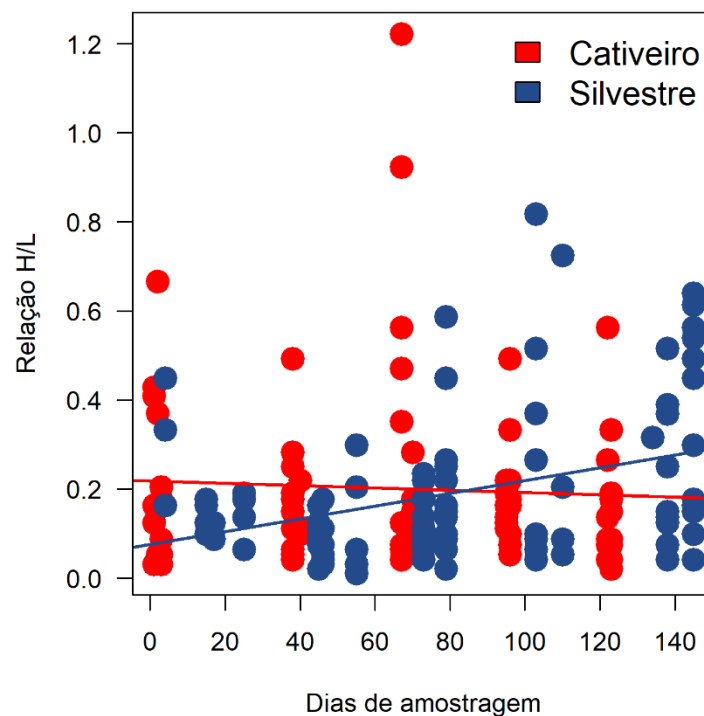
Os valores de condição corporal aumentaram com o avanço da estação reprodutiva, tanto em cativeiro quanto em ambiente selvagem, embora o efeito tenha sido pequeno ( $\beta = 0,19 \pm 0,07$ ,  $t = 2,82$ ,  $p = 0,005$ ). Ambos machos e fêmeas de cativeiro apresentaram maiores valores de condição corporal do que em ambiente selvagem (machos:  $\beta = 0,67 \pm 0,19$ ,  $t = 3,56$ ,  $p = 0,003$ ; fêmeas:  $\beta = 1,34 \pm 0,19$ ,  $t = 7,03$ ,  $p < 0,0001$ ). Fêmeas de cativeiro têm maior condição corporal do que machos de cativeiro ( $\beta = 0,64 \pm 0,20$ ,  $t = 3,27$ ,  $p = 0,007$ ) e também do que machos selvagens ( $\beta = 1,31 \pm 0,18$ ,  $t = 7,11$ ,  $p < 0,0001$ ). Machos e fêmeas selvagens não apresentam diferenças no índice de condição corporal ( $\beta = -0,04 \pm 0,18$ ,  $t = -0,21$ ,  $p = 0,99$ ) (Figura 2).



**Figura 2.** a) Média e intervalos de confiança dos valores de condição corporal de indivíduos de *Volatinia jacarina* em função do sexo e tratamento. b) Variação de condição corporal de indivíduos selvagens e cativos de *V. jacarina* ao longo do período reprodutivo. O primeiro dia de amostragem corresponde ao dia 05/12/2016. Os pontos indicam amostras individuais, a linha indica o coeficiente de relação e a área sombreada indica o intervalo de confiança (n=168, 85 machos e 83 fêmeas, 76 cativos e 92 selvagens).

### 3.2 Estresse – relação heterófilo/linfócito

Em ambiente selvagem, a relação heterófilo/linfócito apresentou aumento com o avanço do período reprodutivo ( $\beta = 0,33 \pm 0,15$ ,  $t = 2,16$ ,  $p = 0,03$ ), enquanto em cativeiro os níveis permaneceram constantes ( $\beta = -0,03 \pm 0,11$ ,  $t = -0,30$ ,  $p = 0,76$ ) (Figura 3). Não houve diferença de relação H/L entre machos e fêmeas ( $F = 1,45$ ,  $df = 1, 17$ ,  $p = 0,23$ ).

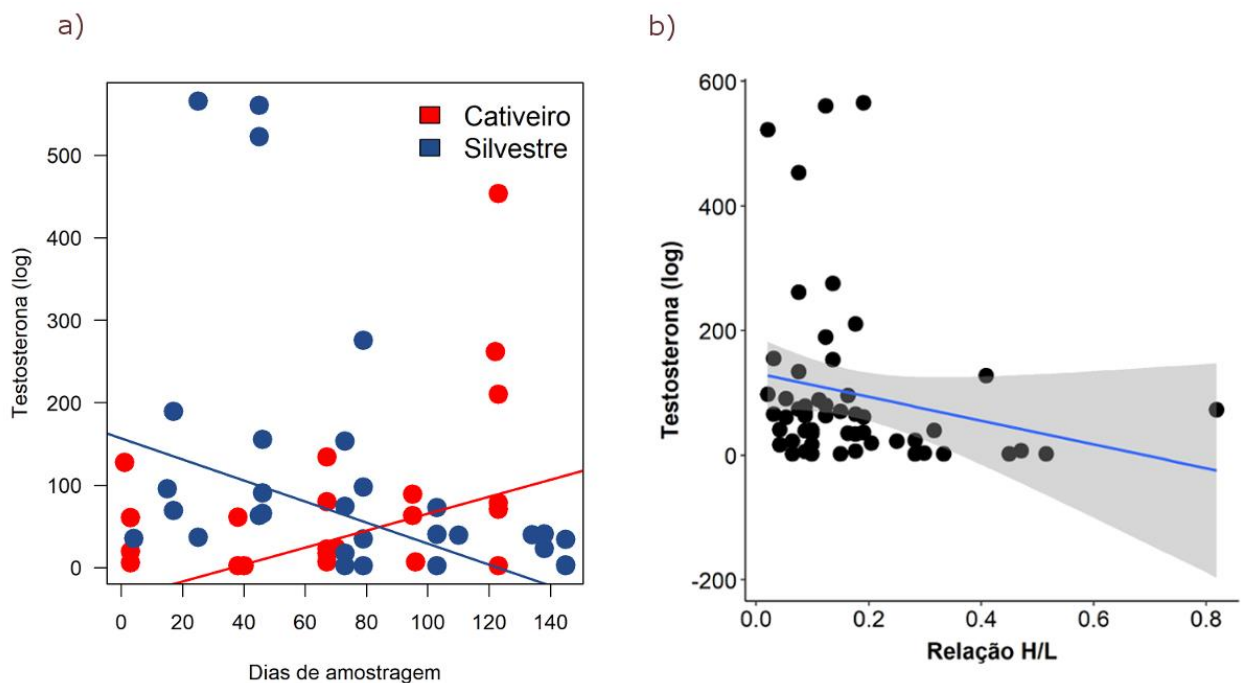


**Figura 3.** Variação da relação H/L de indivíduos selvagens e cativos de *Volatinia jacarina* ao longo do período reprodutivo. O primeiro dia de amostragem corresponde ao dia 05/12/2016. Os pontos indicam amostras individuais e as linhas indicam os coeficientes de relação de cada tratamento (n=173, 90 machos e 83 fêmeas, 77 cativos e 96 selvagens).

### 3.3 Hormônios reprodutivos

#### 3.3.1 Testosterona

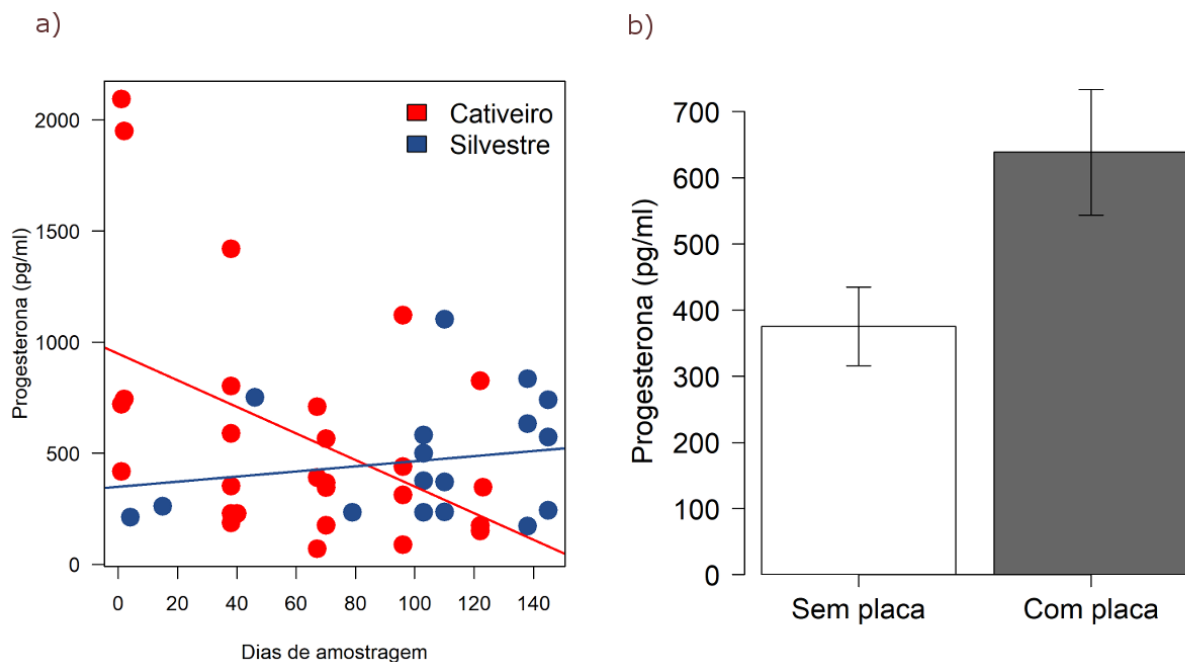
Testosterona e relação H/L tenderam a ser inversamente correlacionadas ( $\beta = -0,25 \pm 0,13$ ,  $t = -1,99$ ,  $p = 0,052$ ), independentemente do tratamento. Em cativeiro, os níveis de testosterona não se correlacionaram com a data ( $\beta = 0,29 \pm 0,19$ ,  $t = 1,52$ ,  $p = 0,13$ ), enquanto em ambiente selvagem a testosterona diminui com o avanço do período reprodutivo ( $\beta = -0,70 \pm 0,26$ ,  $t = -2,72$ ,  $p = 0,009$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** a) Variação de testosterona em machos selvagens e cativos de *Volatinia jacarina* ao longo do período reprodutivo. O primeiro dia de amostragem corresponde ao dia 05/12/2016. Os pontos indicam amostras individuais e as linhas indicam os coeficientes de relação de cada tratamento. b) Correlação entre testosterona e relação H/L em machos de *V. jacarina*. A linha representa o coeficiente de relação e a área sombreada indica o intervalo de confiança (n=53 machos, 22 cativos e 31 selvagens).

### 3.3.2 Progesterona

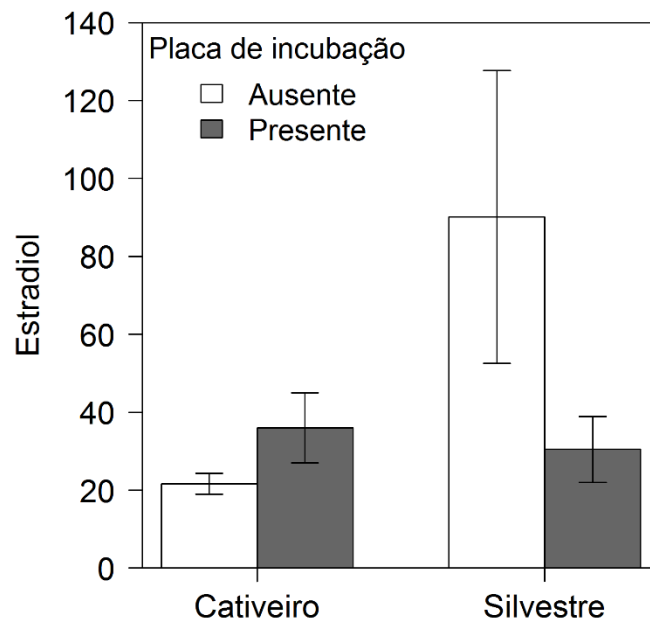
A variação da progesterona ao longo do período reprodutivo apresentou diferenças entre fêmeas de cativeiro e fêmeas selvagens. Em cativeiro, as concentrações de progesterona diminuíram com o passar do tempo ( $\beta = -0,54 \pm 0,20$ ,  $t = -2,65$ ,  $p = 0,012$ ), enquanto em ambiente selvagem as concentrações desse hormônio tenderam a aumentar com o avanço do período reprodutivo ( $\beta = 0,61 \pm 0,32$ ,  $t = 1,92$ ,  $p = 0,062$ ) (Figura 5). Além disso, fêmeas com placa de incubação apresentaram maiores níveis de progesterona ( $\beta = 0,68 \pm 0,30$ ,  $t = 2,32$ ,  $p = 0,026$ ) do que fêmeas sem placa de incubação, independentemente do tratamento (Figura 5).



**Figura 5. a)** Variação da concentração de progesterona em fêmeas selvagens e cativas de *Volatinia jacarina* ao longo do período reprodutivo. O primeiro dia de amostragem corresponde ao dia 05/12/2016. Os pontos indicam amostras individuais e as linhas indicam os coeficientes de relação de cada tratamento **b)** Média e intervalos de confiança de concentração de progesterona de fêmeas de *V. jacarina* em função da presença ou ausência de placa de incubação (n=44 fêmeas, 27 cativas e 17 selvagens, 16 sem placa de incubação e 28 com placa de incubação).

### 3.3.3 Estradiol

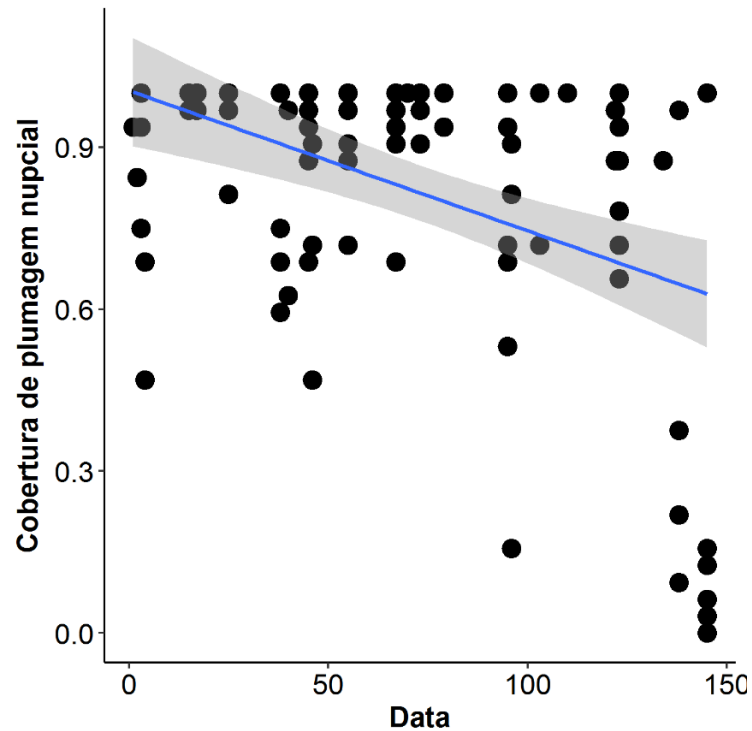
Houve interação da presença ou ausência de placa de incubação com o tratamento ( $F = 5,59$ ,  $df = 1, 21$ ,  $p = 0,028$ ). As concentrações de estradiol foram maiores em fêmeas com placa de incubação, mas apenas em ambiente selvagem ( $\beta = -1,93 \pm 0,82$ ,  $t = -2,36$ ,  $p = 0,028$ ). Em cativeiro, não houve diferença entre fêmeas com ou sem placa de incubação ( $\beta = -0,42 \pm 0,54$ ,  $t = -0,78$ ,  $p = 0,86$ ). Não houve diferença dos níveis de estradiol entre as fêmeas de cativeiro e as fêmeas selvagens com placa de incubação ( $\beta = 0,38 \pm 0,46$ ,  $t = 0,84$ ,  $p = 0,83$ ), e nem entre fêmeas de cativeiro sem placa de incubação e fêmeas selvagens com placa de incubação ( $\beta = -0,03 \pm 0,51$ ,  $t = -0,07$ ,  $p = 0,99$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Média e intervalos de confiança da concentração de estradiol em fêmeas de *Volatinia jacarina* em função do tratamento e da presença ou ausência de placa de incubação ( $n=25$  pools, 8 sem placa de incubação e 17 com placa de incubação, 13 selvagens e 12 cativos).

### 3.4 Cobertura corporal por plumagem nupcial

A cobertura corporal por plumagem nupcial iridescente negro azulada diminuiu com o avanço do período reprodutivo, independentemente do tratamento ( $\beta = -0,33 \pm 0,10$ ,  $t = -3,34$ ,  $p = 0,001$ ) (Figura 7).



**Figura 7.** Variação da média de cobertura corporal por plumagem nupcial em machos de *Volatinia jacarina* ao longo do período reprodutivo. O primeiro dia de amostragem corresponde ao dia 05/12/2016. A linha indica o coeficiente de relação e a área sombreada indica o intervalo de confiança (n=95 machos).

### 3.5 Tempo de permanência em cativeiro

Houve tendência de uma relação negativa entre o tempo em cativeiro e a relação H/L ( $F = 2,80$ ,  $df = 1$ ,  $74$ ,  $p = 0,099$ ;  $\beta = -0,19 \pm 0,11$ ,  $t = -1,67$ ,  $p = 0,099$ ,  $n = 76$ ). Hematócrito ( $F = 0,02$ ,  $df = 1$ ,  $73$ ,  $p = 0,89$ ,  $n=76$ ), condição corporal ( $F = 0,65$ ,  $df = 1$ ,  $72$ ,  $p = 0,42$ ,  $n=76$ ), testosterona ( $F = 1,08$ ,  $df = 1$ ,  $18$ ,  $p = 0,31$ ,  $n=22$ ), progesterona ( $F = 0,45$ ,  $df = 1$ ,  $22$ ,  $p = 0,51$ ,  $n=27$ ) e cobertura

por plumagem iridescente negro azulada ( $F = 0,11$ ,  $df = 1, 34$ ,  $p = 0,74$ ,  $n=37$ ) não foram correlacionados ao tempo de permanência em cativeiro.

#### 4. Discussão

Os resultados obtidos revelaram que, de fato, indivíduos cativos de *Volatinia jacarina* apresentam alterações em quase todos os parâmetros relacionados à reprodução analisados. Apenas as variações temporais de condição corporal, para machos e fêmeas, e de cobertura corporal por plumagem nupcial, para machos, são similares entre indivíduos cativos e selvagens. Todas as outras variáveis analisadas apresentaram alterações, principalmente nos padrões de variação temporal de cada parâmetro.

Os resultados das análises de relação H/L mostraram que houve diferença nos níveis de estresse entre os indivíduos selvagens e cativos de *V. jacarina*, porém esses níveis variaram temporalmente de maneira diferente do que era esperado. Indivíduos cativos iniciaram a estação reprodutiva com maiores níveis de estresse do que indivíduos selvagens. Mas com o passar do tempo, os níveis de estresse dos indivíduos selvagens aumentaram consideravelmente, enquanto em indivíduos cativos esses níveis se mantiveram constantes durante todo o período reprodutivo. Essa diferença da variação temporal dos níveis de estresse pode ser explicada por fatores que se presentes no ambiente selvagem, mas ausentes no ambiente de cativeiro. Primeiramente, em cativeiro, não há risco de predação para os adultos e nem para os ovos e ninhegos. O risco de predação age como indutor de estresse (Lima, 1998; Clinchy *et al.*, 2004; Creel *et al.*, 2009) e, em ambientes naturais, esse risco é constante para os adultos. Com o passar da estação reprodutiva, o risco de predação se estende para os ovos e para os ninhegos, nos quais os adultos investem grande



parte da energia e dos recursos disponíveis, aumentando ainda mais os níveis de estresse dos indivíduos em reprodução. Outro fator que possivelmente influencia a diferença de estresse encontrada entre indivíduos cativos e selvagens é a ausência do desgaste reprodutivo em indivíduos cativos de *V. jacarina*. Todo o investimento individual realizado na geração de prole e na tentativa de garantia de sobrevivência dos filhotes em ambiente selvagem resulta em grandes desgastes fisiológicos para os adultos, que tem consequências diretas nos níveis de estresse (Martin, 1987). O fato de a reprodução não estar ocorrendo em cativeiro poupa os indivíduos cativos de todo esse cenário de desgaste fisiológico e do consequente aumento dos níveis de estresse. Por último, nas fases finais do período reprodutivo, a partir de meados de março, há a redução da quantidade de alimento disponível no ambiente selvagem e começa a surgir a necessidade de produzir reservas energéticas para o deslocamento dos indivíduos que ocorre no final da estação reprodutiva. Essa necessidade de maior empenho e possível competição nas atividades de forrageamento, somada aos grandes consumos energéticos que a reprodução requer, contribui para o aumento dos níveis de estresse dos animais selvagens (Martin, 1987; Wingfield, 1994; Kitaysky *et al.*, 1999). Em cativeiro, há disponibilidade constante de alimento, então a redução da quantidade de alimento disponível não é um fator enfrentado pelos indivíduos cativos. Diversas variações de condições ambientais ocorrem com o passar da estação reprodutiva no ambiente selvagem, mas uma parte considerável delas é ausente nas condições de cativeiro, contribuindo assim para as diferenças observadas entre indivíduos cativos e selvagens em seus níveis de estresse, refletido pela relação H/L.

Em ambiente selvagem, foi observado que os níveis de testosterona de machos declinam com o passar do tempo, ao passo que em cativeiro os níveis de testosterona não se alteram com o tempo. Com a eclosão dos ovos, os machos selvagens investem mais energia no provimento de

cuidado parental para os ninhegos, em detrimento da execução de displays sexuais e da busca por novas oportunidades de cópula. Estudos anteriores demonstram que, em espécies de passeriformes que apresentam cuidado bi parental, machos com maiores níveis de testosterona proveem cuidado parental de menor qualidade do que machos que apresentam níveis reduzidos de testosterona (Adkins-Regan, 2005). *Volatinia jacarina* é uma espécie que apresenta cuidado bi parental (Almeida e Macedo, 2001; Carvalho *et al.*, 2007); portanto, o declínio dos níveis de testosterona ao longo do período reprodutivo é algo esperado em ambientes naturais para essa espécie. A prolactina é o principal hormônio associado ao cuidado parental em aves (Adkins-Regan, 2005) e, se tivesse sido analisado neste estudo, provavelmente seria possível observar um aumento dos níveis desse hormônio nos machos, acompanhando o declínio dos níveis de testosterona. No cativeiro, os níveis de testosterona permaneceram constantes durante todo o período reprodutivo. Isso pode ser explicado pelo fato de que os poucos filhotes que nascem no cativeiro vão a óbito nos primeiros dias após a eclosão dos ovos e, então, não há a necessidade do redirecionamento dos investimentos energéticos da fase de busca por cópulas para a fase de cuidado parental. Assim, os machos continuam com a expectativa de obter algum sucesso reprodutivo e os níveis de testosterona são mantidos elevados durante toda a estação reprodutiva.

As fêmeas de cativeiro apresentaram alterações relacionadas à progesterona e também ao estradiol, em comparação às fêmeas selvagens. Para progesterona, as fêmeas cativas apresentaram um declínio das concentrações desse hormônio ao longo do tempo, enquanto as fêmeas selvagens apresentaram uma tendência de aumento de progesterona com o avanço da estação reprodutiva. A progesterona é um hormônio associado às fases iniciais de incubação de ovos (Askew, 1997; Sockman e Schawbl, 1999), então é esperado que as concentrações desse hormônio aumentem com o avanço do período reprodutivo em ambiente natural, em decorrência da postura de ovos. No

cativeiro, foi observado um declínio significativo dos níveis de progesterona com o passar do tempo. Nas primeiras semanas do estudo, as fêmeas cativas apresentaram níveis de progesterona muito mais elevados do que as fêmeas selvagens. Isso pode ser explicado pelo fato de que algumas fêmeas de cativeiro iniciam a postura de ovos muito antes do que é observado em ambiente natural. Então, enquanto as fêmeas selvagens estavam iniciando as atividades de cópula, ainda procurando e selecionando parceiros, algumas fêmeas de cativeiro já estavam em processo de postura e incubação de ovos. Provavelmente, as fêmeas de cativeiro entram na etapa final da estação reprodutiva antes das fêmeas selvagens, refletindo uma defasagem do ciclo reprodutivo. Talvez esse mesmo declínio dos níveis de progesterona seria observado em fêmeas selvagens nos meses de maio, junho e julho, quando não há mais ninhos em atividade na região do Brasil Central.

Em ambiente selvagem, fêmeas sem placa de incubação apresentaram maiores níveis de estradiol do que fêmeas com placa de incubação. O estradiol é um hormônio relacionado a comportamentos de atração de parceiros e receptividade para cópula em fêmeas (Wingfield e Farner, 1993; Williams, 1999; Leboucher *et al.*, 2000; Adkins-Regan, 2005; Bentley *et al.*, 2006). Assim, é esperado que os níveis de estradiol sejam mais elevados em fêmeas que ainda não estão em processo de cuidado parental e que os níveis desse hormônio sejam mais baixos em fêmeas que apresentam placa de incubação e, portanto, estão em fase de cuidado parental. Em cativeiro, as fêmeas sem placa de incubação apresentaram níveis muito baixos de estradiol, comparáveis aos encontrados em fêmeas selvagens com placa de incubação. Ou seja, fêmeas de cativeiro estão no mesmo estado de reclusão sexual e rejeição de cópula observado em fêmeas selvagens em processo de cuidado parental. No cativeiro, a ausência de fatores necessários para o desenvolvimento das atividades reprodutivas pode explicar a relutância de engajamento em atividades sexuais de fêmeas de *V. jacarina*. Como revisados por Morgan e Tromborg (2007), alguns fatores importantes para a

reprodução e ausentes no cativeiro podem ser citados, como alimentos específicos para a produção de ovos, material ou sítios apropriados para nidificação, espaço físico suficiente para a determinação de territórios e a privação da escolha de parceiros reprodutivos.

Adicionalmente, a diferença dos níveis de hematócrito entre machos e fêmeas também se mostrou alterada no cativeiro. Naturalmente, fêmeas apresentam valores de hematócrito menores do que os de machos (Prinzinger e Misovic, 1994; Ots *et al.*, 1998), principalmente pelo fato de que estrógenos inibem a produção de eritrócitos (Kern *et al.*, 1972; Morton, 1994). Os dados obtidos no presente trabalho para os indivíduos selvagens corroboram resultados de trabalhos anteriores, onde fêmeas selvagens apresentaram menores valores de hematócrito do que machos selvagens (Prinzinger e Misovic, 1994; Kilgas *et al.*, 2006; Norte *et al.*, 2010). Entretanto, em cativeiro fêmeas e machos não apresentaram diferenças nos valores de hematócrito. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que fêmeas cativas possuem níveis muito reduzidos de estradiol e, portanto não há a mesma inibição da produção de eritrócitos.

Apenas dois parâmetros analisados não apresentaram diferenças entre indivíduos selvagens e cativos de *V. jacarina*. As variações temporais de condição corporal, em ambos os sexos, e de proporção de cobertura corporal por plumagem nupcial, em machos, apresentaram os mesmos padrões de variação tanto em indivíduos selvagens quanto em indivíduos cativos. Houve um aumento da condição corporal de indivíduos selvagens e cativos com o passar do período reprodutivo, que pode ser resultado de uma preparação fisiológica para o deslocamento que acontece no final do período reprodutivo, quando a maioria dos indivíduos de *V. jacarina* deixam a área do Brasil Central (Carvalho *et al.*, 2007), mas não se sabe ao certo para onde vão após o período reprodutivo. Tanto os eventos de grandes deslocamentos geográficos quanto os eventos de muda são regulados primariamente por variações de fotoperíodo (Gwinner, 2003; Dawson *et al.*,

2001) e esse fator não foi diferente entre indivíduos selvagens e cativos neste estudo. Os cativos utilizados eram de regime seminatural, onde os animais estavam submetidos a alguns fatores que não variavam entre os indivíduos cativos e os selvagens, como fotoperíodo, temperatura e umidade relativa. Assim, é esperado que fatores majoritariamente regulados por esses parâmetros não variem entre indivíduos cativos e selvagens.

Em conclusão, indivíduos de *V. jacarina* mantidos em cativeiro, de fato, apresentam alterações fisiológicas relacionadas à reprodução e este trabalho é mais um em uma literatura crescente que investiga o efeito da manutenção em cativeiro para espécies de animais. Fatores ambientais de pequena escala exercem papel essencial na regulação da reprodução e, aparentemente, as alterações observadas em *V. jacarina* provêm de um mesmo fator central: a ausência, no cativeiro, de elementos ambientais essenciais para o desenvolvimento adequado das atividades reprodutivas, principalmente em relação às necessidades das fêmeas. Uma possível solução para minimizar os efeitos do cativeiro é a tentativa de simular ao máximo o ambiente e as condições naturais para os quais cada espécie é adaptada. Dietas apropriadas, estímulos e oportunidades de forrageamento, espaços adequados para locomoção e estabelecimento de territórios, disponibilidade de materiais para construção de abrigos ou estruturas para reprodução são elementos essenciais para o desenvolvimento apropriado de atividades biológicas e podem ser incorporados às condições de cativeiro.

Uma melhor compreensão dos mecanismos que resultam em alterações observadas em animais de cativeiro é essencial para o desenvolvimento de pesquisas científicas confiáveis que utilizem animais cativos e, principalmente, para o manejo de espécies ameaçadas de extinção que contam com a manutenção de indivíduos em cativeiro. Uma quantidade considerável de programas de conservação de fauna utiliza a reprodução em cativeiro como forma de aumentar ou viabilizar

populações naturais, e frequentemente, a reprodução dos animais em cativeiro foi ou ainda é uma dificuldade (Fraser, 2008; Harding et al., 2015). Apesar de *V. jacarina* não ser uma espécie ameaçada, os resultados do presente estudo são relevantes para o aprimoramento de programas de conservação que utilizem a manutenção e a reprodução de animais em cativeiro como ferramenta para a conservação de espécies sob risco de extinção. Assim, o desenvolvimento de mais estudos que visem investigar as causas e consequências das alterações observadas em indivíduos cativos, aliado aos esforços para adequação dos cativeiros às necessidades particulares de cada espécie, possibilita o aprimoramento de pesquisas com animais cativos e também de programas de conservação de espécies ameaçadas, tanto para a viabilização de reprodução em cativeiro, quanto para o aumento das taxas de sucesso de reintrodução de indivíduos cativos em ambiente natural.

## 5. Referências Bibliográficas

Adkins-Regan, E. 2005. Hormones and animal social behavior. Princeton University Press.

Almeida, J. B. & Macedo, R. H. 2001. Lek-like mating system of the monogamous blue-black grassquit. *The Auk* 118: 404-411.

Askew, J. A., Georgiou, G. C., Sharp, P. J. & Lea, R. W. 1997. Localization of progesterone receptor in brain and pituitary of the ring dove: influence of breeding cycle and estrogen. *Hormones and Behavior* 32: 105-113.

Bentley, G. E., Jensen, J. P., Kaur, G. J., Wacker, D. W., Tsutsui, K. & Wingfield, J. C. 2006. Rapid inhibition of female sexual behavior by gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Hormones and Behavior* 49: 550-555.

Bleeker, M., Kingma, S. A., Szentirmai, I., Székely, T. & Komdeur, J. 2005. Body condition and clutch desertion in penduline tit *Remiz pendulinus*. *Behaviour* 142: 1465-1478.

Bluhm, C. K., Phillips, R. E., & Burke, W. H. 1983. Serum levels of luteinizing hormone (LH), prolactin, estradiol, and progesterone in laying and nonlaying canvasback ducks (*Aythya valisineria*). *General and Comparative Endocrinology* 52: 1-16.

Bowers, E. K., Hodges, C. J., Forsman, A. N., Vogel, L. A., Masters, B. S., Johnson, B. G. P., Johnson, L. S., Thompson, C. F. & Sakaluk, S. K. 2014. Neonatal body condition, immune responsiveness, and hematocrit predict longevity in a wild bird population. *Ecology* 95: 3027–3034.

- Bustnes, J. O., Erikstad, K. E. & Bjørn, T. H. 2002. Body condition and brood abandonment in common eiders breeding in the high Arctic. *Waterbirds* 25: 63-66.
- Calisi, R. M. & Bentley, G. E. 2009. Lab and field experiments: are they the same animal? *Hormones and Behavior* 56: 1-10.
- Carvalho, C. B. V., Macedo, R. H. F. & Graves, J. A. 2007. Reproduction of Blue-black Grassquits in central Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67: 275-281.
- Chastel, O., Weimerskirch, H. & Jouventin, P. 1995. Body condition and seabird reproductive performance: a study of three petrel species. *Ecology* 76: 2240-2246.
- Clinchy, M., Zanette, L., Boonstra, R., Wingfield, J. C. & Smith, J. N. 2004. Balancing food and predator pressure induces chronic stress in songbirds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271: 2473-2479.
- Creel, S., Winnie, J. A. & Christianson, D. 2009. Glucocorticoid stress hormones and the effect of predation risk on elk reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12388-12393.
- Davis, A. K. 2005. Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology* 76: 334-338.
- Davis, A. K., Maney, D. L. & Maerz, J. C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760-772.
- Dawson, A., King, V. M., Bentley, G. E. & Ball, G. F. 2001. Photoperiodic control of seasonality in birds. *Journal of Biological Rhythms* 16: 365-380.



Desprat, J. L., Mondy, N. & Lengagne, T. 2017. Does testosterone affect foraging behavior in male frogs? *Hormones and Behavior* 90: 25-30.

Deviche, P. & Sharp, P. J. 2001. Reproductive endocrinology of a free-living, opportunistically breeding passerine (white-winged crossbill, *Loxia leucoptera*). *General and Comparative Endocrinology* 123: 268-279.

Dickens, M. J. & Bentley, G. E. 2014. Stress, captivity, and reproduction in a wild bird species. *Hormones and Behavior* 66: 685-693.

Dickens, M. J., Earle, K. A. & Romero, L. M. 2009. Initial transference of wild birds to captivity alters stress physiology. *General and Comparative Endocrinology* 160: 76-83.

Diniz, P., Ramos, D. M. & Macedo, R. H. 2015. Attractive males are less than adequate dads in a multimodal signalling passerine. *Animal Behaviour* 102: 109-117.

Doucet, S. M. 2002. Structural plumage coloration, male body size, and condition in the blue-black grassquit. *The Condor* 104: 30-38.

Fraser, D. J. 2008. How well can captive breeding programs conserve biodiversity? A review of salmonids. *Evolutionary Applications* 1: 535-586.

Folstad, I. & Karter, A. J. 1992. Parasites, bright males, and the Immunocompetence Handicap. *The American Naturalist* 139: 603-622.

Ghasemi, A. & Zahediasl, S. 2012. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *International journal of endocrinology and metabolism* 10: 486.

- Gross, W. B. & Siegel, H. S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases* 27: 972-979.
- Gwinner, E. 2003. Circannual rhythms in birds. *Current Opinion in Neurobiology* 13: 770-778.
- Harding, G., Griffiths, R. A. & Pavajeau, L. 2016. Developments in amphibian captive breeding and reintroduction programs. *Conservation Biology* 30: 340-349.
- Hau, M., Ricklefs, R. E., Wikelski, M., Lee, K. A. & Brawn, J. D. 2010. Corticosterone, testosterone and life-history strategies of birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 3203-3212.
- Hill, J. A., Enstrom, D. A., Ketterson, E. D., Nolan Jr, V. & Ziegenfus, C. 1999. Mate choice based on static versus dynamic secondary sexual traits in the dark-eyed junco. *Behavioral Ecology* 10: 91-96.
- Hilmer, S., Algar, D., Neck, D. & Schleucher, E. 2010. Remote sensing of physiological data: Impact of long term captivity on body temperature variation of the feral cat (*Felis catus*) in Australia, recorded via ThermoChron iButtons. *Journal of Thermal Biology* 35: 205-210.
- Hõrak, P., Ots, I. & Murumägi, A. 1998. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology* 12: 750-756.
- Jain, N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Philadelphia, PA.
- Kern, M. D., William, A. & King, J. R. 1972. Effects of gonadal hormones on the blood composition of white-crowned sparrows. *General and Comparative Endocrinology* 18: 43-53.

- Kilgas, P., Mänd, R., Mägi, M. & Tilgar, V. 2006. Hematological parameters in brood-rearing great tits in relation to habitat, multiple breeding and sex. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 144: 224-231.
- Kimball, R. T. & Ligon, J. D. 1999. Evolution of avian plumage dichromatism from a proximate perspective. *The American Naturalist* 154: 182-193.
- Kitaysky, A. S., Wingfield, J. C. & Piatt, J. F. 1999. Dynamics of food availability, body condition and physiological stress response in breeding black-legged kittiwakes. *Functional Ecology* 13: 577-584.
- Kraaijeveld, K., Kraaijeveld-Smit, F. J. & Komdeur, J. 2007. The evolution of mutual ornamentation. *Animal Behaviour* 74: 657-677.
- Labocha, M. K. & Hayes, J. P. 2012. Morphometric indices of body condition in birds: a review. *Journal of Ornithology* 153: 1-22.
- Lacava, R. V., Brasileiro, L., Maia, R., Oliveira, R. F. & Macedo, R. H. 2011. Social environment affects testosterone level in captive male blue-black grassquits. *Hormones and Behavior* 59: 51-55.
- Larcombe, A. N. & Withers, P. C. 2007. Effects of long-term captivity on thermoregulation, metabolism and ventilation of the southern brown bandicoot (Marsupialia: Peramelidae). *Journal of Comparative Physiology B* 177: 229-236.
- Lattin, C. R., Pechenko, A. V. & Carson, R. E. 2017. Experimentally reducing corticosterone mitigates rapid captivity effects on behavior, but not body composition, in a wild bird. *Hormones and Behavior* 89: 121-129.

Leboucher, G., Béguin, N., Lacroix, A. & Kreutzer, M. 2000. Progesterone inhibits female courtship behavior in domestic canaries (*Serinus canaria*). *Hormones and Behavior* 38: 123-129.

Lima, S. L. 1998. Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Advances in the Study of Behavior* 27: 215-290.

Macedo, R. H., Manica, L. & Dias, R. I. 2012. Conspicuous sexual signals in a socially monogamous passerine: the case of neotropical Blue-black Grassquits. *Journal of Ornithology* 153: 15-22.

Magalhães, R. B., Diniz, P. & Macedo, R. H. 2014. Plumage coverage is related to body condition and ectoparasitism in blue-black grassquits. *Wilson Journal of Ornithology* 126: 581-584.

Manica, L. T., Graves, J. A., Podos, J. & Macedo, R. H. 2016. Multimodal flight display of a neotropical songbird predicts social pairing but not extrapair mating success. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70: 2039-2052.

Martin, T. E. 1987. Food as a limit on breeding birds: a life-history perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 453-487.

Mason, G. J. 2010. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 713-721.

Maia, R., Eliason C. M., Bitton, P. P., Doucet, S. M. & Shawkey, M. 2013. pavo: an R package for the analysis, visualization and organization of spectral data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 906-913.

- McFarlane, J. M. & Curtis, S. E. 1989. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil: lymphocyte ratio. *Poultry Science* 68: 522-527.
- McEwen, B. S. 2005. Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 30: 315-318.
- Morgan, K. N. & Tromborg, C. T. 2007. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102: 262-302.
- Morton, M. L. 1994. Hematocrits in montane sparrows in relation to reproductive schedule. *Condor* 96: 119-126.
- Navarro, J., González-Solís, J. & Viscor, G. 2007. Nutritional and feeding ecology in Cory's shearwater *Calonectris diomedea* during breeding. *Marine Ecology Progress Series* 351: 261-271.
- Norte, A. C., Ramos, J. A., Sampaio, H. L., Sousa, J. P. & Sheldon, B. C. 2010. Physiological condition and breeding performance of the great tit. *The Condor* 112: 79-86.
- Ots, I., Murumägi, A. & Hõrak, P. 1998. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* 12: 700-707.
- Pereira, L. B. R. 2009. A coloração estrutural em tizius (*Volatinia jacarina*, Aves: Emberezidae): influência do meio social e aspectos da qualidade individual. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade de Brasília.
- Priedkalns, J., Oksche, A., Vleck, C. & Bennett, R. K. 1984. The response of the hypothalamo-gonadal system to environmental factors in the zebra finch, *Poephila guttata castanotis*. *Cell and Tissue Research* 238: 23-35.

Prinzinger, R. & Misovic, A. 1994. Blood of birds-an allometric review of its components. *Journal Fur Ornithologie* 135: 133-165.

Robinson, S., Chiaradia, A. & Hindell, M. A. 2005. The effect of body condition on the timing and success of breeding in Little Penguins *Eudyptula minor*. *Ibis* 147: 483-489.

Romero, L. M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128: 1-24.

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

Sick, H. 2001. *Ornitologia Brasileira: Uma Introdução*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.

Small, T. W., Sharp, P. J. & Deviche, P. 2007. Environmental regulation of the reproductive system in a flexibly breeding Sonoran Desert bird, the rufous-winged sparrow, *Aimophila carpalis*. *Hormones and Behavior* 51: 483-495.

Sockman, K. W. & Schwabl, H. 1999. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. *General and Comparative Endocrinology* 114: 257-268.

Taff, C. C. & Freeman-Gallant, C. R. 2014. An experimental test of the testosterone mediated oxidation handicap hypothesis in a wild bird. *Hormones and Behavior* 66: 276-282.

Tinbergen, J. M. & Verhulst, S. 2000. A fixed energetic ceiling to parental effort in the great tit? *Journal of Animal Ecology* 69: 323-334.

- Tveraa, T., Sether, B. E., Aanes, R. & Erikstad, K. E. 1998. Regulation of food provisioning in the Antarctic petrel; the importance of parental body condition and chick body mass. *Journal of Animal Ecology* 67: 699-704.
- Vleck, C. M. & Priedkalns, J. 1985. Reproduction in zebra finches: hormone levels and effect of dehydration. *The Condor* 87: 37-46.
- Warkentin, I. G. & West, N. H. 1990. Impact of long-term captivity on basal metabolism in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 96: 379-381.
- Wendeln, H. & Becker, P. H. 1999. Effects of parental quality and effort on the reproduction of common terns. *Journal of Animal Ecology* 68: 205-214.
- Wiebe, K. L. & Martin, K. 1998. Costs and benefits of nest cover for ptarmigan: changes within and between years. *Animal Behaviour* 56: 1137-1144.
- Williams, T. D. 1999. Parental and first generation effects of exogenous 17 $\beta$ -estradiol on reproductive performance of female zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Hormones and Behavior* 35: 135-143.
- Wingfield, J. C. 1994. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. *In: Davey, K. G., Peter, R. E. & Tobe, E. E. (eds). Perspectives in Comparative Endocrinology. National Research Council of Canada, Ottawa, 520-528.*
- Wingfield, J. C. & Farner, D. S. 1993. The endocrinology of wild species. *In: Farner, D. S, King, J. R. & Parkes, K. C. (eds.) Avian Biology. Academic Press, New York, 163-327.*

Wingfield, J. C., Hahn, T. P., Levin, R. & Honey, P. 1992. Environmental predictability and control of gonadal cycles in birds. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 261: 214-231.

Wingfield, J. C., Hahn, T. P., Maney, D. L., Schoech, S. J., Wada, M. & Morton, M. L. 2003. Effects of temperature on photoperiodically induced reproductive development, circulating plasma luteinizing hormone and thyroid hormones, body mass, fat deposition and molt in mountain white-crowned sparrows, *Zonotrichia leucophrys oriantha*. *General and Comparative Endocrinology* 131: 143-158.

Wingfield, J. C., Jacobs, J. D., Tramontin, A. D., Perfito, N., Meddle, S., Maney, D. L. & Soma, K. 2000. Towards an ecological basis of hormone–behavior interactions in reproduction of birds. *In: Wallen, K., Schneider, J. E. (eds.), Reproduction in Context*. MIT Press, Cambridge, MA, 85–128.

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

Wingfield, J. C. & Romero, L. M. 2000. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates, *In: McEwen, B. S. (eds.), Handbook of Physiology, Section 7: The Endocrine System, Volume 4: Coping With The Environment: Neural and Endocrine Mechanisms*, Oxford University Press, Oxford, 211–236.