

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**Efeito do estresse por risco de predação sobre a condição
física do Tiziu (*Volatinia jacarina*)**

João Victor de Oliveira Caetano

Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena Ferraz Macedo

Brasília-DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

JOÃO VICTOR DE OLIVEIRA CAETANO

Título:

“Efeito do estresse por risco de predação sobre a condição física do Tiziu
(*Volatinia jacarina*)”

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Reginia Helena Ferraz Macedo
Presidente / Orientador
ZOO/UnB

Prof. Dr. James Joseph Roper
Membro Titular
LECB/UVV

Prof. Dr. Miguel Ângelo Marini
Membro Titular
ZOO/UnB

Brasília, 22 de março de 2013.

Agradecimentos

Para que esse trabalho fosse realizado recebi muito apoio e acho que é muito importante agradecer a todos que auxiliaram na sua realização. O seu desenvolvimento encontrou diversos desafios mas a perseverança na ideia foi essencial para a sua realização.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Profa. Regina Macedo que sempre me deu todo apoio ao longo da realização do trabalho sempre acreditando na ideia a ser desenvolvida e me dando puxões de orelha quando era necessário. Também agradeço aos membros da banca de defesa, Prof. James Roper e Prof. Miguel Marini pelas sugestões e críticas que contribuíram bastante para melhorar a dissertação.

Gostaria de agradecer também a Maya Romano Maia que contribuiu muito para o trabalho desde o desenvolvimento teórico do projeto até a limpeza das gaiolas dos passarinhos. Com certeza a sua contribuição e sua amizade foram essenciais para esse trabalho.

Agradeço também a Claudia Merlo, Giane Salles e Yara Ballarini que foram estagiárias durante a realização dos experimentos e deram uma contribuição muito importante.

Agradeço aos meus companheiros do curso de pós-graduação Raphael Igor, Leonardo Castilho, Paula Sicsu, Danilo Fortunato, Pedro Diniz, Marcos Robalinho, Lilian Manica, Alexandre Dias e todos aqueles que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização do trabalho, seja em relação às longas discussões sobre análises estatísticas ou nas conversas durante os momentos de distração.

Uma importante contribuição foi a da minha namorada Marina Marinho que sempre me apoiou, me ajudando desde os momentos de tensão durante o mestrado até acordar cedo para cuidar dos passarinhos. Seu apoio foi essencial para mim.

Gostaria de agradecer à minha família por me apoiar nesse mestrado e por entender todos aqueles momentos em que estive ausente por conta dos compromissos com o curso e o projeto.

Agradeço à coordenação de aperfeiçoamento técnico do ensino superior (CAPES) pela bolsa de estudos para a realização do mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia por todo o apoio.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
Introdução.....	3
Objetivos	8
Materiais e Métodos	9
Período de condicionamento antes do procedimento experimental.....	9
Indução do crescimento das penas.....	10
Manipulação experimental com vocalizações	10
Avaliação das variáveis resposta.....	12
Análise dos dados.....	13
Resultados	16
Análises das medidas corporais	16
Análises imunológicas	19
Discussão.....	21
Referências.....	26
Anexo 1.....	30
Anexo 2.....	30

Resumo

A ação de predadores no ambiente natural tem grande importância sobre a biologia das espécies. Os seus efeitos são importantes para diversos aspectos de história de vida de aves, uma vez que animais desse grupo podem estar expostos a situações de risco devido a características como a reprodução em ninhos, suas cores chamativas e comportamentos de exibição. Esse trabalho visa avaliar a importância dos efeitos não letais da predação sobre o tiziu (*Volatinia jacarina*). Essa espécie é muito comum na região do cerrado brasileiro e efeitos de predação podem ter uma grande influência sobre a mesma, seja pelos altos índices de predação de ninho registrados ou pela grande conspicuidade dos machos. Para atingir esse objetivo foi realizado um experimento controlado em laboratório em que foi induzida uma condição estressante artificial nos animais por meio da reprodução de vocalizações de aves predadoras. Uma redução na condição imunológica e um menor crescimento das penas retrizes dos grupos que escutaram vocalizações de predadores indicam que a condição experimental induziu estresse nos animais. A redução no crescimento de penas retrizes observada apenas para machos é uma evidência de que eles são mais afetados por aves predadoras do que fêmeas. Esse resultado é um indicativo de que os caracteres sexuais secundários e o comportamento de exibição dos machos pode expor os mesmos à ação de predadores visualmente orientados. Os resultados encontrados indicam que as pistas auditivas podem ter grande importância como estratégia anti-predação para o tiziu e que as mesmas podem ter grandes consequências sobre aspectos de história de vida dessa espécie.

Abstract

The influence of predators in natural environments is a central factor in the biology of many species. Predator effects are especially important in shaping the life history of birds because of characteristics such as the use of nests for breeding, bright plumage colors and display behaviors. The objective of this study was to evaluate the importance of non-lethal effects of predation on the Blue-black Grassquit (*Volatinia jacarina*). This species is very common in the Brazilian savanna and predation may have a strong influence in shaping behavior and morphology of this bird because of the high nest predation rates and the pronounced conspicuousness of the males. To achieve the study's goal we conducted a controlled experiment in the laboratory to induce stress in the animals through artificial production of vocalizations of avian predators. We found that birds exposed to these vocalizations had reduced feather growth patterns, and exhibited immune depression. A differential response of the two sexes to the stressful condition was also observed, suggesting that males have a stronger reaction to avian predators than females. Possibly, this is due to the greater threat of predators to males because of their unusual motor display and nuptial coloration, which can expose them to visually oriented avian predators. The results indicate that auditory cues from predators induce stress and in natural conditions may be used to develop important predator avoidance strategies in the Blue-black Grassquit.

Introdução

Animais estão sob a influência constante de fatores ambientais que provocam estresse. Situações que envolvem risco de predação, escassez de recursos alimentares, alterações no ambiente, e substâncias tóxicas são fatores indutores de estresse que têm grande relevância na história de vida de animais, desempenhando importante papel no processo de seleção natural (Wingfield et al. 1998).

A compreensão do tema predação é muito importante, uma vez que processos ecológicos que estabelecem a composição de populações e comunidades estão diretamente associados a esse fenômeno (Cresswell 2008). O estudo dessa relação entre os organismos visa responder perguntas sobre o que é predação, qual o seu efeito sobre os predadores e as presas, quais fatores biológicos determinam a dieta de um animal e quais estratégias são usadas por predadores para obterem suas presas. Uma definição do que é a predação é difícil, a partir do momento em que se observa que diversos seres vivos se alimentam de outros sem que necessariamente possa se definir essa relação como predação. Exemplos ocorrem no caso de detritívoros, como fungos e bactérias. Uma definição funcional de predação seria o consumo de um organismo por outro no qual a presa deve estar viva quando o predador inicialmente a ataca (Begon et al. 2006).

Efeitos não letais da predação têm grandes influências sobre características de uma espécie. Em geral, na maioria das vezes a ação de um predador não resulta em morte da presa, gerando um processo de estresse nos indivíduos que foram ameaçados. Consequências não letais para a aptidão individual de animais sob-risco de predação ocorrem por meio de redução nas taxas de forrageamento, crescimento e reprodução (Cresswell 2008). Foi observado que efeitos não letais causados por predadores em muitos casos têm uma consequência mais intensa sobre as populações de suas presas do

que aqueles associados a uma morte direta. Em uma revisão realizada com 44 publicações foi contabilizado que cerca de 85% dos efeitos de predadores sobre suas presas são do tipo não letal (Preisser et al. 2005).

Os estudos de reações fisiológicas dos organismos frente às várias demandas e desafios associados à sobrevivência são de grande importância para se compreender como as condições ambientais moldam comportamentos adaptativos. Desta forma, a compreensão dos mecanismos fisiológicos deflagrados em um animal sob-risco de predação é importante para entender condições que podem ser denominadas como estresse (Wingfield et al. 1998). Pode-se definir o estresse como as respostas fisiológicas de um animal frente às condições em que a demanda ambiental excede a capacidade regulatória natural do organismo. Dessa forma podem ser consideradas como estresse alterações fisiológicas extremas decorrentes de respostas ao risco de predação que são responsáveis por alterar a homeostase do organismo (Koolhaas et al. 2011).

Durante o processo estressante nos vertebrados a ativação das glândulas pituitária, adrenal e o hipotálamo aumenta a produção de glicocorticoides. Com o aumento da quantidade desses hormônios ocorre a indução de um estado de alerta nos organismos, provocando alterações fisiológicas e comportamentais (Johnson et al. 1992). Essas mudanças aumentam a chance de sobrevivência do organismo, porém envolvem uma relação de troca de custos e benefícios entre a capacidade reprodutiva e o risco de mortalidade (Wingfield & Sapolsky 2003). Por exemplo, aves da família Tyrannidae sob risco de predação apresentaram efeitos como a perda de peso e a produção de proteínas relacionadas ao estresse (Thomson et al. 2010). Efeitos negativos intensos sobre o sucesso reprodutivo já foram observados para *Melospiza melodia*, com

uma redução de 40% na sua prole quando gravações de predadores foram reproduzidas próximas a seus sítios reprodutivos (Zanette et al. 2011).

Características corporais de aves também podem ser afetadas pela condição estressante, incluindo alterações no desenvolvimento e formação das penas e no estabelecimento dos seus padrões de coloração (McGraw et al. 2002; Talloen et al. 2008). Alterações na coloração estrutural de penas estão associadas à sua ultraestrutura, a qual pode ser drasticamente alterada por influencia do estresse (Jovani & Blas 2004). Modificações na qualidade de características ornamentais, como penas coloridas, podem levar a uma diminuição do sucesso reprodutivo do animal, similarmente ao que ocorre no caso da ação de parasitas que muitas vezes têm efeito negativo sobre a coloração de aves (Hamilton & Zuk 1982).

Alguns fatores fisiológicos são influenciados pelo processo estressante e podem ser utilizados como indicadores confiáveis dos níveis de estresse. Em geral, a medição dos níveis de corticosteroides na circulação sanguínea é utilizada como indicador dessa condição no animal (Siegel 1980; Gross & Siegel 1983). No entanto, essa medida deve ser utilizada com bastante cautela uma vez que os seus níveis apresentam variações muito rápidas (Clinchy et al. 2011), podendo refletir outros fatores além do grau de estresse habitual, como a própria captura do animal para a retirada da amostra de sangue. Os efeitos da condição estressante sobre o sistema imunológico também são interessantes de serem explorados como indicadores, uma vez que o mesmo está bastante relacionado com os níveis de glicocorticoide sanguíneo (Maxwell 1993). A condição imune, porém, não apresenta uma variação tão dinâmica em resposta ao estresse como a que acontece com a variação nos níveis de glicocorticóides. Medidas como a contagem total de leucócitos e a proporção entre as células imunes heterófilas e

linfócitos classicamente são utilizadas como variáveis indicadoras da condição de estresse dos animais (Gross & Siegel 1983; Ots et al. 1998; Owen & Moore 2006).

O tiziu (*Volatinia jacarina*) é uma espécie de ave da família Emberezidae muito abundante na região da América tropical, estando presente desde o sul do México até o norte da Argentina (Sick 2001). Essas aves exibem dimorfismo sexual com machos apresentando uma coloração nupcial preto-azulada e as fêmeas uma coloração críptica ao longo de todo o ano (Carvalho et al. 2006). Os tizius machos são conhecidos por possuírem coloração iridescente (Maia et al. 2009), fenômeno resultante da refração da luz incidente sobre as penas, no qual o comprimento predominantemente refratado varia de acordo com o ângulo de incidência de luz. O padrão de coloração iridescente pode ser observado em uma grande variedade de aves como beija-flores, gansos e pombos (Grenewalt et al. 1960). Nas penas dos tizius dois componentes principais são responsáveis por determinar esse padrão de coloração: uma camada de queratina, que atua refletindo os comprimentos de onda de alta frequência, e a camada inferior de grânulos de melanina que atua como isolante, tornando mais eficiente a refração de radiação do espectro ultravioleta (Maia et al. 2009). Possíveis alterações na conformação das camadas que compõem essas penas poderiam resultar em modificações nos padrões de coloração das mesmas (Maia et al. 2009), o que justificaria a observação de dependência dos padrões de coloração dos machos em relação à sua condição física (Doucet 2002).

Os tizius se reproduzem em áreas abertas de gramíneas formando aglomerados de pequenos territórios defendidos pelos machos. Os machos desempenham uma exibição comportamental notável, executando saltos com várias batidas das asas e simultaneamente emitindo uma vocalização. O padrão de aglomeração dos machos com a conspicuidade do display assemelha-se a um *lek* (Carvalho et al. 2006). O ninho

desses animais é do tipo taça aberta e tanto machos como fêmeas exercem cuidado parental (Alderton 1963), estando o mesmo sujeito a altos níveis de predação (Aguilar et al. 2008). Essas características são importantes indicadores de que o efeito de predadores pode exercer grande influência sobre essa espécie.

Em geral para aves, observa-se que ocorre uma taxa de mortalidade maior para fêmeas, fato explicado principalmente pelo fato de as mesmas estarem mais expostas a predadores durante o período de incubação dos ovos (Donald 2007). Porém, em muitas espécies de grupos taxonômicos diversos, características de machos sexualmente selecionadas, que permitem um aumento na sua capacidade de combate e na atratividade para fêmeas, ocorrem à custa de uma redução nas suas taxas de sobrevivência (Darwin 1859). Por exemplo, em ambiente natural mais machos do que fêmeas do caranguejo *Uca beebei* são predados por aves da espécie *Quiscalus mexicanus* (Koga et al. 2001). Os caranguejos machos possuem garras maiores e cores bastante brilhantes, características que justificam o fato de os predadores os encontrarem mais facilmente. O comportamento de exibição do tiziu macho e o seu padrão conspicuo de coloração podem ser características importantes para que esses animais sejam mais suscetíveis a predadores visualmente orientados, como outras aves.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo testar a hipótese de que a simulação do risco de predação, por meio da reprodução de vocalização de predadores, induz uma condição de estresse no tiziu. A expectativa é de que a reprodução de tais vocalizações produziria suficiente estresse para afetar de forma negativa características corporais mensuráveis, incluindo: peso, crescimento e formação das penas e condição imunológica. Para testar essa hipótese, utilizamos um grupo experimental de tizius em cativeiro submetidos a vocalizações de aves predadoras e um grupo controle de indivíduos submetidos a vocalizações de aves não predadoras. As previsões da hipótese são de que:

- O grupo experimental submetido às vocalizações de predadores, em comparação com o grupo controle, ficará estressado e sofrerá consequências negativas no crescimento e formação do padrão de coloração das penas;
- Ocorrerá uma diminuição na massa corporal de indivíduos do grupo experimental submetido ao fator potencialmente estressante (vocalização de predadores) com relação aos indivíduos do grupo controle;
- Os indivíduos do grupo experimental submetidos à condição de potencial estresse (vocalização de predadores) exibirão uma alteração na condição imunológica, esperando-se um aumento no valor da proporção heterófilo:linfócito e uma redução na contagem total de leucócitos relativa à contagem de eritrócitos;
- Machos terão respostas mais intensas às vocalizações de predadores em relação às fêmeas.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado com aves mantidas no Aviário Científico do Laboratório de Comportamento Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os tizius mantidos em cativeiro foram capturados na Fazenda Água Limpa (15° 56' 58,21''S, 47° 55' 57,60''O), de propriedade da Universidade de Brasília em março de 2009 e abril de 2010, sendo subsequentemente mantidos em cativeiro com comida e água *ad libitum*. A alimentação foi feita com a ração Nutrópica® Passaros Brasileiros específica para pequenos Passeriformes que dispensa a utilização de outros suplementos na alimentação.

Para o experimento foram formados dois grupos: um composto por indivíduos submetidos à condição potencialmente indutora de estresse por meio da reprodução de vocalizações de aves predadoras (grupo denominado experimental), e um grupo controle que foi submetido à vocalização de aves não predadoras (detalhes abaixo). Ambos os grupos foram isolados acusticamente e cada um dos tratamentos foi composto por metade de machos e a outra metade de fêmeas. No experimento foram utilizados 132 indivíduos ao total, sendo 72 no ano de 2009 e 60 no ano de 2010. As duas repetições do experimento seguiram o mesmo procedimento que foi constituído das seguintes etapas, detalhadas abaixo.

Período de condicionamento antes do procedimento experimental

Os animais foram condicionados em pequenos grupos de 3 indivíduos em gaiolas de 70cm x 40cm x 30cm e foram providos com quantidades padronizadas de água e ração durante todo o tempo dos experimentos. Cada gaiola continha indivíduos de um mesmo sexo, escolhidos ao acaso, os quais eram submetidos à uma mesma condição experimental. Depois de separados nas gaiolas e antes do início do

procedimento todos os animais passaram por um período de 20 dias de habituação aos recintos, ao final do qual o peso foi medido e o crescimento das penas foi induzido.

Indução do crescimento das penas

Após o período de condicionamento e logo antes do início do experimento foram retiradas as três primeiras penas (retrizes) do lado esquerdo da cauda dos animais e várias penas da região dorsal entre as asas (área aproximada de 10mm x 15mm). Tal procedimento foi executado para induzir o crescimento de novas penas, desenvolvidas sob a condição potencialmente estressante.

Manipulação experimental com vocalizações

As aves do grupo experimental, submetidas a vocalizações de predadores e as aves do grupo controle, submetidas às vocalizações de não-predadores, foram expostas à condição experimental por 15 dias durante uma hora sorteada nos horários de 8 h, 12 h ou 16h para evitar o processo de habituação às condições do experimento. As vocalizações foram reproduzidas com o mesmo equipamento e tocadas para os dois grupos com um mesmo padrão de volume. As vocalizações utilizadas foram retiradas do website do projeto Xeno-canto (Xeno-Canto-Foudation 2009, <http://www.xeno-canto.org/>), triadas e editadas para retirar trechos de cantos de outras aves (software Raven Lite 1.0, 2008). Para os dois tratamentos foram utilizadas 15 espécies diferentes (Tabela 1) com três gravações de vocalizações de cada espécie. Com o objetivo de evitar habituação (Thompson 2009) as espécies cujos cantos foram reproduzidos no experimento foram alternadas diariamente. A escolha das vocalizações dos possíveis predadores para o grupo experimental e não-predadores para o grupo controle foi

baseada nas características do comportamento alimentar de cada ave predadora (Sick 2001) e na ocorrência dessas espécies na região do Distrito Federal (Braz 2001).

Tabela 1. Espécies cujas vocalizações foram utilizadas para o experimento. A tabela está dividida entre possíveis aves predadoras e não predadoras do tiziu.

Predadores		Não-Predadores	
Família	Espécie	Família	Epécie
Accipitridae	<i>Gampsonyx swainsonii</i>	Caprimulgidae	<i>Hydropsalis albicollis</i>
Accipitridae	<i>Accipiter striatus</i>	Tyrannidae	<i>Elaenia cristata</i>
Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>	Tyrannidae	<i>Tyrannus savana</i>
Accipitridae	<i>Buteo brachyurus</i>	Donacobiidae	<i>Donacobius atricapilla</i>
Falconidae	<i>Micrastur ruficollis</i>	Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>
Falconidae	<i>Falco rufigularis</i>	Turdidae	<i>Turdus amaurochalinus</i>
Falconidae	<i>Falco femoralis</i>	Mimidae	<i>Mimus saturninus</i>
Strigidae	<i>Tyto alba</i>	Coerebidae	<i>Coereba flaveola</i>
Strigidae	<i>Megascops choliba</i>	Thraupidae	<i>Saltator maximus</i>
Strigidae	<i>Glaucidium brasilianum</i>	Thraupidae	<i>Saltator similis</i>
Strigidae	<i>Athene cunicularia</i>	Thraupidae	<i>Saltatricula atricollis</i>
Strigidae	<i>Aegolius harrisii</i>	Thraupidae	<i>Neothraupis fasciata</i>
Strigidae	<i>Asio clamator</i>	Emberizidae	<i>Zonotrichia capensis</i>
Corvidae	<i>Cyanocorax cristatellus</i>	Emberizidae	<i>Sporophila nigricollis</i>
Corvidae	<i>Cyanocorax cyanopogon</i>	Icteridae	<i>Molothrus bonariensis</i>

Avaliação das variáveis resposta

As variáveis medidas para cada indivíduo ao final do experimento, foram o peso corporal, o comprimento das penas retrizes, e medidas de coloração das penas coberteiras. A condição imunológica dos animais foi avaliada ao início e final do experimento. As medidas de peso foram realizadas com balança de precisão de 0.01g. As penas coberteiras e as penas retrizes tiveram o seu crescimento induzido no início do período de 15 dias de experimento e ao seu final foram retiradas e armazenadas em local seco e sem contato com a luz para medição posterior.

A medida de coloração das penas coberteiras foi obtida utilizando-se o padrão de reflectância medido por meio de um espectrofotômetro Ocean Optics USB4000 (Dunedin, Florida) com uma fonte de luz de xenônio pulsado (PX-2, Ocean Optics, Dunedin, Florida) que fornece iluminação com um comprimento de onda de 200-750 nm. Para a realização das medições foi utilizado um suporte para as fibras óticas que permite medições com um ângulo de incidência de luz de 45° (Maia et al. 2009). Esse ângulo de incidência de luz admite uma avaliação do padrão de luz refratada por superfícies com coloração iridescente. As medidas de reflectância foram armazenadas e avaliadas através do programa SpectraSuite, próprio para medidas coletadas com o equipamento utilizado.

Para as medidas de coloração 10 penas coberteiras foram posicionadas sobre uma superfície de papel camurça preto, posicionadas como na superfície do animal (Quesada & Senar 2006). Para cada indivíduo foram feitas três medições das mesmas penas reposicionando o suporte de fibras óticas a cada uma delas de forma a se obter a maior reflectância. A média das três medidas foi utilizada como os valor de referencia de reflectância para cada indivíduo. Após a coleta desses dados os mesmos foram processados utilizando-se o programa R (R Development Core Team 2012) com o

pacote pavo instalado, o qual é um script que permite a análise de informações de coloração provenientes das medidas de reflectância (Maia et al. 2013). As medidas de coloração utilizadas para as análises foram brilho, contraste, intensidade e matiz (Doucet 2002), as quais são todas derivadas do espectro de reflectância com comprimentos de onda de 300nm a 700nm.

Na segunda repetição do experimento foram realizadas análises imunológicas dos animais com base na quantidade de leucócitos relativa à quantidade total de eritrócitos (Ots et al. 1998); e na proporção heterófilo:linfócito (Gross & Siegel 1983). Ambas as medidas avaliadas são importantes indicadores da condição imunológica dos animais (Owen & Moore 2006). O sangue foi coletado através de punção da veia braquial/ulnar utilizando lancetas esterilizadas descartáveis. Esfregaços de sangue foram feitos e fixados com metanol absoluto. Os hemogramas e análises foram realizados em laboratório comercial (Santé Laboratório, Brasília-DF) contabilizando-se o número de hemácias e o número de leucócitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos). A contagem total de leucócitos foi padronizada utilizando o número relativo do total de células leucocitárias em relação à quantidade de hemácias contabilizadas nos campos de visão da leitura do esfregaço. Uma redução na contagem total de leucócitos e um aumento no valor da razão heterófilo:linfócito são considerados como indicadores de uma redução na condição imunológica do animal (Gross & Siegel 1983).

Análise dos dados

A primeira parte das análises estatísticas considerou apenas os resultados dos grupos controle e experimental ao final do experimento, uma vez que as alterações decorrentes do desgaste das penas retrizes e das penas coberteiras coletadas no início do

experimento poderiam vir a ter grande influencia nas análises. As medidas de peso corporal, coloração e crescimento das penas retrizes foram analisadas em conjunto utilizando-se uma análise multivariada de variância (MANOVA) (Quin & Keough 2002). A análise considerou como variáveis explicativas o sexo da ave e o tipo de vocalização (se de ave predadora ou não-predadora). O efeito aleatório decorrente da realização de dois experimentos foi considerado na análise através da metodologia de blocos aleatórios (Quin & Keough 2002) uma vez que algum possível efeito fisiológico poderia ser decorrente da mudança das aves para um novo aviário na repetição do experimento (em 2010).

A variação na condição imunológica dos animais foi avaliada separadamente uma vez que essa análise foi realizada apenas para a repetição do experimento ocorrida em 2010. Para essa análise foi computada uma medida subtraindo-se a condição final de cada animal da sua condição inicial, de forma a se ter uma medida de mudança da condição imunológica entre o início e o final do experimento. Nesse caso, valores negativos são indicativos de uma redução no valor da medida imunológica ao final do experimento. Subsequentemente, essas medidas de variação nas condições imunológicas de proporção heterofilos e linfócitos e contagem total de leucócitos foram avaliadas em conjunto por meio de uma MANOVA considerando como variáveis explicativas o sexo do indivíduo e o tipo de vocalização à qual os mesmos estavam sendo submetidos.

Após a execução das duas MANOVAs os efeitos significativos das variáveis explicativas foram avaliados por meio de ANOVAs realizadas para cada uma das variáveis resposta (Quin & Keough 2002). Nas situações em que ocorreram interações significativas entre variáveis explicativas, as mesmas foram investigadas construindo-se

modelos lineares para machos e fêmeas, separadamente, de forma a verificar como o efeito da condição experimental atuava sobre os dois sexos.

Nessas análises as premissas de normalidade foram avaliadas por meio de inspeção visual de gráficos com os valores ranqueados dos resíduos dos modelos em relação a um conjunto de dados também ranqueados pertencentes à uma distribuição normal teórica. As premissas de homocedasticidade foram testadas por meio do teste de Bartlett (Crawley 2007). A correlação entre as variáveis resposta foram avaliadas por meio de uma matriz de correlação de Pearson. Variáveis com valores de correlação maiores do que 0.5 ou menores do que -0.5 foram retiradas da análise

Resultados

Análises das medidas corporais

A avaliação do efeito das variáveis explicativas sobre as medidas corporais indicou que ocorreu uma redução no crescimento das retrizes dos machos submetidos à vocalizações de predadores. Outro efeito observado foi a influencia do ano sobre a medida de coloração de brilho (valores médios das variáveis na Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios (\pm desvio padrão) das medidas corporais ao final do experimento com os seus respectivos desvios padrões para machos e fêmeas submetidos às diferentes condições de manipulação (Controle vs. Experimental)

Variáveis	Fêmeas		Machos	
	Controle (n=32)	Experimental (n=27)	Controle (n=29)	Experimental (n=28)
Peso	11.2 \pm 1.0g	10.9 \pm 1.1g	10.7 \pm 1.7g	10.9 \pm 1.0g
Retriz	3.0 \pm 0.3cm	3.2 \pm 0.4cm	3.2 \pm 0.3cm	3.1 \pm 0.3cm
Brilho	7964.0 \pm 3000.3	7866.6 \pm 2417.5	7948.8 \pm 2771.9	8241.0 \pm 2724.4
Intensidade	31.4 \pm 10.5	30.4 \pm 8.0	28.7 \pm 9.3	29.1 \pm 8.6
Contraste	18.8 \pm 6.21	17.5 \pm 4.3	17.3 \pm 7.8	15.1 \pm 6.6
Matiz	699.4 \pm 1.3nm	699.6 \pm 1.0nm	340.9 \pm 53.39nm	327.7 \pm 43.6nm

Ao se realizar a análise de correlação das variáveis resposta, no entanto, observou-se que a variável de coloração referente à intensidade apresenta grande correlação com as medidas de contraste e brilho Tabela 3. Dessa forma, essa medida foi retirada do modelo utilizado para investigar os efeitos de sexo e condição experimental sobre as variáveis corporais.

Tabela 3 Matriz de correlação das medidas corporais dos animais. Para a realização desses cálculos foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. As correlações consideradas altas estão destacadas por um asterisco.

	Massa	Retriz	Brilho	Intensidade	Contraste	Matiz
Massa	-	-	-	-	-	-
Retriz	-0.18	-	-	-	-	-
Brilho	-0.02	0.16	-	-	-	-
Intensidade	-0.03	0.16	0.94*	-	-	-
Contraste	-0.08	0.16	0.36	0.61*	-	-
Matiz	0.14	-0.08	-0.05	0.08	0.12	-

A MANOVA indicou que ocorre uma interação significativa entre as variáveis explicativas de sexo e condição experimental ($F_{1,111}=2.41$, $P=0.04$) (Anexo 1).

Analisando-se individualmente as variáveis resposta observou-se que esse efeito é significativo apenas para o crescimento de penas retrizes ($F_{1,111}= 8.05$, $P= 0.005$). A construção de modelos lineares para cada um dos sexos, com o objetivo de compreender a natureza dessa interação, indicou que a condição experimental não teria efeito sobre fêmeas (Equação: “Comprimento da Retriz”= $3.03+0 \times$ Condição-Experimental, $F_{1,57}=3.13$, $P=0.082$, $r^2=0.035$). Porém um efeito significativo pode ser observado para o crescimento das penas retrizes de machos (Equação: “Comprimento da Retriz”= $3.25-0.17 \times$ Condição-Experimental, $F_{1,55}=5.12$, $P=0.03$, $r^2=0.068$). Dessa forma, observa-se que machos submetidos à vocalização de predadores teriam um menor crescimento de suas penas retrizes (Figura 1).

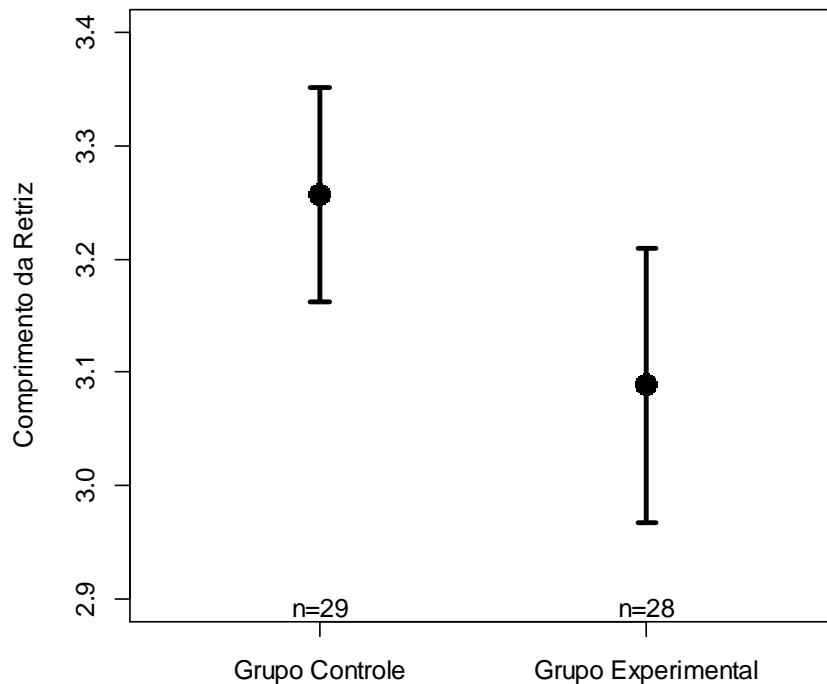


Figura 1. Valor médio do comprimento das penas retrizes dos tizius machos nos grupos Controle versus Experimental, com os seu respectivos intervalos de confiança de 95%.

Um efeito aleatório significativo do ano do experimento foi observado na mesma análise utilizada para se avaliar as medidas corporais ($F_{1,111}=3.04$, $P=0.01$), porém na análise independente das variáveis fica claro que o efeito aleatório só é significativo para a medida de brilho das penas coberteiras (ANOVA: $F_{1,111}= 10.6$, $P<0.01$). Não é possível, no entanto, determinar o possível significado deste resultado, pois entre anos os animais foram transferidos para um novo aviário, e qualquer um de vários fatores que não a condição experimental de indução de estresse (e.g. condições de iluminação, espaço, ruídos, etc.) pode ter sido responsável por esta variação no brilho das penas.

Análises imunológicas

Nas análises das medidas imunológicas foi observado um efeito significativo da condição estressante apenas para a proporção heterófilo:linfócito (Tabela 4: valores médios da condição imunológica).

Tabela 4. Valores médios(\pm DP) da variação do início para o final do experimento na condição imunológica de cada indivíduo. Os valores apresentados são em relação à proporção Heterófilo/Linfócito e Leucócito/Eritrócito nos grupos Controle e Experimental do início para o final do experimento.

Variáveis	Grupo Controle		Grupo Experimental	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Número de indivíduos	n=10	n=7	n=10	n=11
Heterófilo/Linfócito	0.28 \pm 0.76	0.23 \pm 1.05	-0.81 \pm 1.26	-0.77 \pm 1.11
Leucócito/Eritrócito	-0.01 \pm 0.03	-0.01 \pm 0.02	0 \pm 0.02	-0.03 \pm 0.04

Para a análise dos dados imunológicos verificou-se que a correlação entre as duas variáveis resposta é de 0.12, sendo então consideradas pouco correlacionadas. O resultado da MANOVA indicou um efeito significativo das vocalizações de predadores sobre a condição imunológica dos animais ($F_{1,34}=4.38$, $P=0.02$) (Anexo 2). Avaliando-se cada uma das variáveis resposta individualmente por meio de ANOVAs observou-se que esse efeito é significativo somente para a proporção heterófilo:linfócito ($F_{1,34}= 9.04$, $P<0.01$), indicando valores menores do índice resultante da diferença entre a condição final e inicial de cada indivíduo, o que corresponde a menores valores para essa medida imunológica (Figura 2).

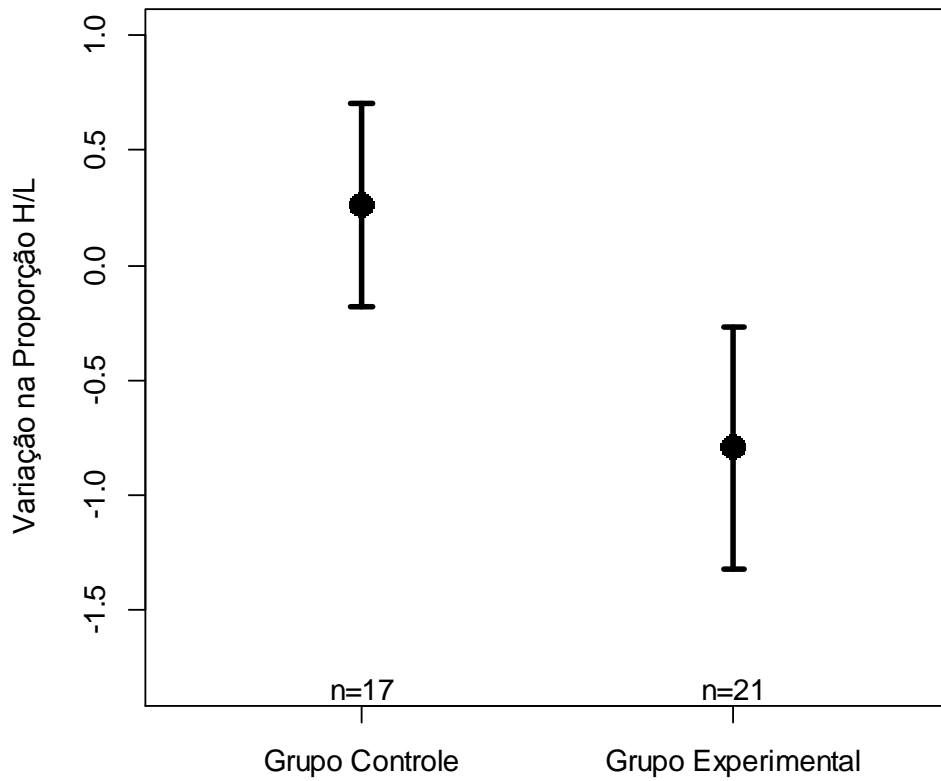


Figura 2 Valores médios da variação individual da proporção heterófilo:linfócito para cada indivíduo do início para o final do experimento, nos grupos controle e experimental com os seu respectivos intervalos de confiança de 95%.

Discussão

Os resultados encontrados indicam que a reprodução de vocalizações de predadores gera uma condição estressante no tiziu, mas esse estresse se manifesta de forma diversificada e com diferenças entre os sexos. Tínhamos uma série de predições específicas referentes à como o potencial estresse induzido pelas vocalizações de predadores poderiam afetar as aves, e abaixo tratamos cada expectativa individualmente.

Primeiramente, esperávamos que o grupo potencialmente estressado sofresse consequências negativas no crescimento e formação do padrão de coloração de penas. Essa predição foi corroborada pela redução do crescimento de penas retrizes em machos submetidos à condição estressante. Não houve efeito da condição experimental sobre os padrões de coloração da plumagem, no entanto. Existem evidências de que o estresse decorrente de causas variadas, de modo geral, pode induzir menores velocidades no crescimento de penas e também à sua má formação (Jenkins et al. 2001; Bortolotti & Murza 2002; Jovani & Blas 2004; Talloen et al. 2008). Alterações na taxa de crescimento e condição das penas podem ter reflexos negativos diretos sobre a capacidade de voo dos animais (Grubb 2006). No presente estudo, portanto, considera-se que as vocalizações de predadores atuaram como um fator estressante durante um longo período e, portanto tiveram um efeito direto sobre a capacidade de formação das penas dos machos de tiziu.

Mesmo tendo ocorrido um efeito da condição estressante sobre o crescimento e o estabelecimento dos padrões de coloração das penas dos tizius, esse pode ter sido atenuado pelo fato de os animais terem alimento *ad libitum*. Os resultados também indicam que, nesse aspecto, o estresse teve um impacto maior sobre os machos. A

redução de processos anabólicos, que subsidia a formação das penas, ocorre em animais submetidos à condição estressante e serve como adaptação para que o animal aloque energia para vias metabólicas que teriam prioridade para a sobrevivência imediata do animal (Wingfield et al. 1998). No ambiente natural os animais submetidos à ação de predadores não possuem uma fonte de alimentação rica em nutrientes disponível a todo o momento, como a provida durante o experimento. Dessa forma, podemos concluir que a ameaça de predação na forma de vocalizações, mesmo em condições de alimentação abundante, produz um efeito de estresse considerável, e suficiente para reduzir o crescimento de penas retrizes dos machos.

A predição de que animais submetidos à condição estressante teriam uma redução na sua massa corporal não foi confirmada pelos dados coletados no experimento. Esse resultado pode ser um possível efeito da alimentação disponibilizada *ad libitum*. A ativação de processos catabólicos no organismo durante o processo de estresse fisiológico tem grande importância para se mobilizar recursos energéticos que serão importantes para manter o estado de alerta do animal (Wingfield et al. 1998). Dessa forma a alimentação serviria como uma válvula de escape para que os animais mantenham esse estado sem grandes prejuízos à sua condição corporal, evitando assim a redução da massa corporal.

Foi inicialmente predito para o experimento que tizius submetidos à condição de potencial estresse através da vocalização de predadores teriam uma alteração na sua condição imunológica, esperando-se (i) um aumento no valor da proporção heterófilo:linfócito; e (ii) uma redução na contagem total de leucócitos relativa à contagem de eritrócitos. Um resultado oposto ao esperado foi encontrado para a proporção heterofilo:linfócito, ou seja, foram encontrados valores menores do índice resultante da diferença entre a condição final e inicial de cada indivíduo. Esse resultado

potencialmente contrário à predição pode ser explicado, porém, pelo fato de que esse índice (heterófilo:linfócito) aparentemente responde de forma diferente dependendo do período de estresse ao qual o indivíduo está submetido. Verificou-se que reduções nos valores desse índice correspondem a resultados observados em longos períodos de estresse contínuo (Gross & Siegel 1983; Maxwell 1993). Aparentemente, estímulos estressantes de longa duração são acompanhados de uma expressiva basocitose com subsequente diminuição da razão heterófilo:linfócito, como foi verificado em experimentos com aves submetidas a restrições alimentares por períodos extensos de até 20 dias (Maxwell et al. 1990). Portanto, a resposta imune observada no experimento corresponde a um estágio secundário do processo estressante sobre a condição imunológica de aves. O fato de a contagem total de leucócitos não ter sido influenciada pela condição experimental pode ser devido a essa medida não ser um indicador tão correlacionado com a condição estressante, sendo que resultados derivados desse parâmetro em geral são discutidos em conjunto com medidas mais precisas como a proporção heterófilo:linfócito, e medição dos níveis de glicocorticoide sanguíneo (Gross & Siegel 1983).

A predição de que machos teriam respostas mais intensas às vocalizações de predadores em relação às fêmeas foi corroborada em relação à medida de crescimento das penas retrizes. Esse resultado é um indicativo fisiológico de que ocorre uma percepção diferenciada dos dois sexos em relação aos seus possíveis predadores. Apesar de as fêmeas de aves classicamente estarem submetidas a altas taxas de predação (Donald 2007), especialmente durante o período de nidificação, os machos possuem características como busca mais ativa por parceiros, execução de corte, e comportamentos de exibição e sinalização acústica que podem chamar mais a atenção de predadores (Magnhagen 1991). A conspicuidade dos comportamentos de exibição do

tiziu pode expor mais os machos à ação de predadores visualmente orientados, como os utilizados no experimento. Esse resultado é um indicativo de que predadores podem afetar os dois sexos de maneira diferenciada e que machos teriam capacidade de reconhecer predadores que possivelmente representariam uma maior ameaça à sua sobrevivência. Nessa situação um nível de estresse fisiológico mais alto sobre machos resultaria em consequências mais intensas sobre a sua condição corporal do que em fêmeas.

A observação de efeitos significativos da condição estressante sobre os tizius, induzida pela vocalização de predadores, e mesmo com alimentação *ad libitum*, é um indicativo da importância dos predadores sobre as populações naturais do tiziu. Os efeitos observados sobre esses animais indicam que os mesmos interpretam as vocalizações como uma situação de risco independentemente da presença do predador no ambiente. Esse resultado é uma evidência de que as vocalizações podem resultar em um importante efeito indireto da predação na sobrevivência do tiziu. Em ambiente natural os efeitos de predadores sobre a população de presas podem ser bem maiores do que aqueles atribuídos à morte direta por predação. Custos de respostas anti-predação são responsáveis pela redução de taxas de reprodução e o aumento de mortes decorrentes de outros fatores (Lima 1998; Creel & Christianson 2008). Em geral, o estudo dos efeitos não letais da predação de maneira dissociada da morte direta se mostra um desafio (Lima 1998), de forma que estudos em ambiente controlado (e.g. Sheriff et al. 2009) e o presente trabalho permitem uma melhor compreensão dos efeitos indiretos da predação.

Diversas espécies de aves reconhecem e respondem a pistas auditivas produzidas por predadores (Miller 1952; Hauser & Caffrey 1994; Rainey et al. 2004). Os resultados deste estudo apontam para a importância das pistas auditivas para a sobrevivência do

tiziu. Como os tizius utilizados no experimento foram capturados em ambiente natural e posteriormente mantidos em cativeiro, a capacidade dos mesmos de reconhecer as vocalizações dos predadores pode ser atribuída a um contato prévio com os mesmos, de forma que esse seria um ponto interessante a ser explorado com relação à capacidade que o tiziu tem em avaliar situações de risco em seu ambiente. Outro aspecto a ser explorado seria o reconhecimento de diferentes tipos de predadores, fator que já foi observado para outras espécies de aves (Rainey et al. 2004; Reudink et al. 2007). Finalmente, é bastante possível que os resultados aqui encontrados para o tiziu possam ser extrapolados para muitas outras espécies de aves com características similares, no que se refere à vulnerabilidade à predação e os efeitos fisiológicos gerados pelo estresse mediante a exposição ao risco de predação.

Referências

- Aguilar, T. M., Dias, R. I., Oliveira, A. C. & Macedo, R. H.** 2008. Nest-site selection by Blue-black Grassquits in a Neotropical savanna: do choices influence nest success? *Journal of Field Ornithology*, **79**, 24–31.
- Alderton, C. C.** 1963. The breeding behavior of the blue-black grassquit. *The Condor*, **65**, 154–162.
- Begon, M., Townsend, C. R. & Harper, J. L.** 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. Fourth Ed. edn. Blackwell Publishing.
- Bioacoustics Research Program.** 2008. Raven Lite: Interactive Sound Analysis Software(version 1.1).
- Bortolotti, G. R. & Murza, G. L.** 2002. Stress during feather development predicts fitness potential. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 333–342.
- Braz, V. S.** 2001. A representatividade de áreas protegidas do Distrito Federal na conservação da avifauna do Cerrado. *Ararajuba*, **9**, 61–69.
- Carvalho, C. B. V, Macedo, R. H. & Graves, J. A.** 2006. Breeding strategies of a socially monogamous neotropical passerine: extra-pair fertilization, behavior, and morphology. *The Condor*, **108**, 579–590.
- Clinchy, M., Zanette, L., Charlier, T. D., Newman, A. E. M., Schmidt, K. L., Boonstra, R. & Soma, K. K.** 2011. Multiple measures elucidate glucocorticoid responses to environmental variation in predation threat. *Oecologia*, **166**, 607–14.
- Crawley, M. J.** 2007. *The R Book*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Creel, S. & Christianson, D.** 2008. Relationships between direct predation and risk effects. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 194–201.
- Cresswell, W.** 2008. Non-lethal effects of predation in birds. *Ibis*, **150**, 3–17.
- Darwin, C.** 1859. *The Origin of Species*. John Murray, London.
- Donald, P. F.** 2007. Adult sex ratios in wild bird populations. *Ibis*, **149**, 671–692.
- Doucet, S. M.** 2002. Structural plumage coloration, male body size, and condition in the blue-black grasquit. *The Condor*, **104**, 30–38.
- Greenwalt, C. H., Brandt, W. & Friel, D. D.** 1960. The iridescent colors of hummingbird feathers. *Proceedings of the American Philosophical Society*, **104**, 249–253.
- 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.

- Grubb, T. C.** 2006. *Ptilochronology: Feather time and the biology of birds*. Oxford: Oxford University Press.
- Hamilton, W. D. & Zuk, M.** 1982. Heritable true fitness and bright birds : A role for parasites ? *Science*, **218**, 384–387.
- Hauser, M. D. & Caffrey, C.** 1994. Antipredator response to raptor calls in wild crows, *Corvus brachyrhynchos hesperis*. *Animal Behaviour*, **48**, 1469–1471.
- Jenkins, K. D., Hawley, D. M., Farabaugh, C. S. & Cristol, D. a.** 2001. Ptilochronology reveals differences in condition of captive white-throated sparrows. *The Condor*, **103**, 579.
- Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P. & Gold, P. W.** 1992. Mechanisms of stress : a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, **16**, 115–130.
- Jovani, R. & Blas, J.** 2004. Adaptive allocation of stress-induced deformities on bird feathers. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 294–301.
- Koga, T., Backwell, P. R. Y., Christy, J. H., Murai, M. & Kasuya, E.** 2001. Male-biased predation of a fiddler crab. *Animal Behavior*, 201–207.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., Boer, S. F. De, Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., Van-Dijk, G., Wöhr, M. & Fuchs, E.** 2011. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **35**, 1291–1301.
- Lima, S. L.** 1998. Nonlethal effects in the ecology of predator-prey interactions. *BioScience*, **48**, 25–34.
- Magnhagen, C.** 1991. Predation risk as a cost of reproduction. *Trends in Ecology & Evolution*, **6**, 183-186.
- Maia, R., Caetano, J. V. O., Bão, S. N. & Macedo, R. H.** 2009. Iridescent structural colour production in male blue-black grassquit feather barbules : the role of keratin and melanin. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, **6**, s203–s211.
- Maia, R., Eliason, C. & Bitton, P.-P.** 2013. pavo: Perceptual analysis, visualization and organization of color data.
- Maxwell, M. H.** 1993. Avian blood leucocyte responses to stress. *World`s Poultry Science Journal*, **49**, 34–44.
- Maxwell, M. H., Robertson, G. W. & Spence, S.** 1990. Comparison of haematological values in restricted and ad-libitum fed domestic fowls: Red blood cell characteristics. *British Poultry Science*, **31**, 407-413.

- McGraw, K. J., Mackillop, E. a, Dale, J. & Hauber, M. E.** 2002. Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental plumage. *The Journal of Experimental Biology*, **205**, 3747–3755.
- Miller, L.** 1952. Auditory recognition of predators. *The Condor*, **54**, 89–92.
- Ots, I., Mrumagi, A. & Hõrak, P.** 1998. Haematological health state indices of reproducing great tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology*, **12**, 700–707.
- Owen, J. C. & Moore, F. R.** 2006. Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *The Condor*, **108**, 389–398.
- Preisser, E. L., Bolnick, D. I. & Bernard, M. F.** 2005. Scared to death? The effects of intimidation and consumption in predator-prey interactions. *Ecology*, **86**, 501–509.
- Quesada, J. & Senar, J. C.** 2006. Comparing plumage colour measurements obtained directly from live birds and from collected feathers: the case of the great tit *Parus major*. *Journal of Avian Biology*, **37**, 609–616.
- Quin, G. P. & Keough, M. J.** 2002. *Experimental Designing and Data Analisis for Biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.
- R Development Core Team.** 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Rainey, H. J., Zuberbühler, K. & Slater, P. J. B.** 2004. The responses of black-casqued hornbills to predator vocalisations and primate alarm calls. *Behaviour*, **141**, 1263–1277.
- Reudink, M. W., Nocera, J. J. & Curry, R. L.** 2007. Anti-predator responses of neotropical residente and migrant birds to familiar and unfamiliar owl vocalizations on the Yucatan peninsula. *Ornitologia Neotropical*, **18**, 543–552.
- Sheriff, M. J., Krebs, C. J. & Boonstra, R.** 2009. The sensitive hare : sublethal effects of predator stress on reproduction in snowshoe hares. *Journal of Animal Ecology*, **78**, 1249–1258.
- Sick, H.** 2001. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Siegel, H. S.** 1980. Physiological stress in birds. *BioScience*, **30**, 529–534.
- Talloon, W., Lens, L., Dongen, S. Van & Matthysen, E.** 2008. Feather development under environmental stress : lead exposure effects on growth patterns in great tits *Parus major*. *Bird Study*, **55**, 108–117.
- Thompson, R. F.** 2009. Neurobiology of learning and memory habituation : A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, **92**, 127–134.

Thomson, R. L., Tomás, G., Forsman, J. T., Broggi, J. & Mönkkönen, M. 2010. Predator proximity as a stressor in breeding flycatchers: mass loss, stress protein induction, and elevated provisioning. *Ecology*, **91**, 1832–1840.

Wingfield, J. C. & Sapolsky, R. M. 2003. Reproduction and resistance to stress: When and how. *Journal of Neuroendocrinology*, **15**, 711–724.

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.

Xeno-Canto-Foudation. 2009. Xeno-Canto.

Zanette, L. Y., White, A. F., Allen, M. C. & Clinchy, M. 2011. Perceived predation risk reduces the number of offspring songbirds produce per year. *Science*, **334**, 1398–1400.

Anexo 1

Tabela 5. Resultados da análise multivariada de variância utilizada para avaliar as medidas corporais dos animais. A probabilidade das variáveis que tiveram uma participação significativa na explicação das variáveis respostas estão destacadas por um asterisco. A variável de ano em que o experimento foi realizado está destacada pois foi adicionada como um efeito aleatório na análise.

Variáveis	Graus de Liberdade	Pillai	Valor de F	Valor de P
Sexo	1	0.94	319.00	<0.001*
Tratamento	1	0.07	1.82	0.11
Ano do experimento*	1	0.12	3.04	0.01*
Tratamento:Sexo	1	0,10	2.41	0.04*
Resíduos	111		-	-

Anexo 2

Tabela 6. Resultados da análise multivariada de variância das medidas de condição imunológica dos animais. A probabilidade das variáveis que tiveram uma participação significativa na explicação das variáveis respostas estão destacadas por um asterisco.

Variáveis	Graus de Liberdade	Pillai	Valor de F	Valor de P
Sexo	1	0.03	0.53	0.59
Tratamento	1	0.21	4.38	0.02*
Tratamento:Sexo	1	0.07	1.31	0.28
Resíduos	34		-	-