



**Universidade  
Federal de  
Uberlândia**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA  
E CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS**

**ECOLOGIA DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO:  
EFEITOS DA MALÁRIA SOBRE A COLORAÇÃO DE  
CAROTENOIDES NA PLUMAGEM E CONDIÇÃO  
CORPORAL DE AVES EM ÁREA DE CERRADO**

**VICTOR AGUIAR DE SOUZA PENHA**

**JANEIRO DE 2017**

**VICTOR AGUIAR DE SOUZA PENHA**

**ECOLOGIA DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO:  
EFEITOS DA MALÁRIA SOBRE A COLORAÇÃO DE  
CAROTENOIDES NA PLUMAGEM E CONDIÇÃO  
CORPORAL DE AVES EM ÁREA DE CERRADO**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós  
Graduação em Ecologia e Conservação de  
Recursos Naturais da Universidade  
Federal de Uberlândia para obtenção do  
título de Mestre em Ecologia e  
Conservação de Recursos Naturais.

**Orientador  
Professor Dr. Kleber Del Claro**

**UBERLÂNDIA, MG  
JANEIRO DE 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P399e  
2017

Penha, Victor Aguiar de Souza, 1990

Ecologia da interação parasito-hospedeiro: efeitos da malária sobre a coloração de carotenoides na plumagem e condição corporal de aves em área de cerrado: saturação de coloração e deposição de carotenoides: como parasitos afetam coloração de plumagem em / Victor Aguiar de Souza Penha. - 2017.

39 f. : il.

Orientador: Kleber Del-Claro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.146>  
Inclui bibliografia.

1. Ecologia - Teses. 2. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 3. Plasmodium - Teses. 4. - Teses. I. Del-Claro, Kleber. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. III. Título.

---

CDU: 574

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

VICTOR AGUIAR DE SOUZA PENHA

# ECOLOGIA DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO: EFEITOS DA MALÁRIA SOBRE A COLORAÇÃO DE CAROTENOÍDES NA PLUMAGEM E CONDIÇÃO CORPORAL DE AVES EM ÁREA DE CERRADO

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

APROVADA em 10 de Fevereiro de 2017

**Professor Dr. Oswaldo Marçal Junior** **UFU**

**Professora Dra. Maria Alice Alves dos Santos      UERJ**

**Professor Dr. Kleber Del Claro**  
**UFU**  
**(Orientador)**

# UBERLÂNDIA, MG JANEIRO DE 2017

## DEDICATÓRIA

**“Eu nunca poderia pensar em educação sem amor. É por isso que me considero um educador, acima de tudo porque sinto amor”. Paulo Freire**

**“Escrevo. E pronto.  
Escrevo porque preciso,  
preciso porque estou tonto.  
Ninguém tem nada com isso.  
Escrevo porque amanhece,  
E as estrelas lá no céu  
Lembram letras no papel,  
Quando o poema me anoitece.  
A aranha tece teias.  
O peixe beija e morde o que vê.  
Eu escrevo apenas.  
Tem que ter por quê?”**

**Paulo Leminski, poema intitulado como “Razão de ser”**

**Por que fazemos ciência? Por que somos ciência. A matéria viva ao qual estudamos não é por distante um decreto inacabado, mas, sim, retrato e fase daquilo que somos. Há razão para fazer o que fazemos? Há e ponto. Há porque sinto que ser ciência é sentir amor a nos mesmos, é amar-se e olhar ao outro, um outro você. O peixe é você, que sente e morde o que quer. Mordamos a ciência, sejamos a ciência como ela deve ser. É preciso ser acima de tudo, reflexo e ação.**

**Dedico essa obra, que até aqui, de minha vida, às pessoas que me formaram. Em primeiro lugar, a meu pai, Nilson, e minha mãe, Márcia, que são vocativos de meus sujeitos aonde quer que eu vá. Desde cedo aprendi a discutir, aprendi a ser ciência, por cabeças tão importantes. Sem vocês, eu nada seria. Aos meus irmãos, que junto a mim, seguem esse caminho, de ser reflexo e ação, daquilo que somos por inerência.**

**Dedico também as pessoas próximas a mim, amigos, familiares distantes que contribuíram de alguma forma com a minha formação. Aos laboratórios com os quais passei, e, em principal, ao que faço parte hoje, que de todas as formas me permitiu viver nesse mundo.**

**“Toda interação, qualquer que seja, é acima de tudo aquilo que somos por essência e aquilo que a interação nos permite ser”. Deixo essa frase de minha autoria, um amante dos estudos em interação, para que entendamos os reflexos da ação de viver com o outro.**

**Não desistam da Ciência, só através dela e da Educação que um país muda.**

**Há braços, sempre.**

**Victor Aguiar de Souza Penha**

## AGRADECIMENTOS

**Agradeço em primeiro lugar à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento e o investimento ao cientista. Já que a bolsa não é um investimento direto na ciência, e, sim, ao cientista. Agradeço ao Laboratório de Ecologia Comportamental e de Interações (LECI), da Universidade Federal de Uberlândia, por ter me acolhido sempre, sob a figura do Professor Dr. Kleber Del Claro, que abriu as portas e permitiu que eu fizesse aquilo que foi meu sonho. Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, como um indivíduo nascido em Uberlândia, é uma honra e prazer ter feito parte dessa comunidade por quase uma década. Agradeço também, por fim, aos programas que me formaram recentemente: Universidade da República do Uruguai, por ter financiado o curso de verão em Modelos Mistos; ao Long Point Bird Observatory, e Birds Studies Canada, por terem financiado minha ida ao Canadá, local em que me tornei anilhador da América do Norte, e que auxiliou na minha formação enquanto ornitólogo e passarinheiro e, por fim, ao Programa Ciência sem Fronteira. Esse trabalho é fruto do investimento do Governo Federal, sob presidência de Dilma Rousseff, que investiu em mim, e possibilitou a minha ida aos Estados Unidos, local onde fiz um estágio e que mudou minha vida. Sem esse programa, certamente, as várias portas que se abriram a mim, não teriam sido abertas. Agradeço a todos que me auxiliaram em campo, sob nomes: Gudryan Jackson Barônio, Luiza Ribeiro, Liegy Resede, Renan Martins, Thiago, Regiane Rodrigues, Luana Pfeffer, ao Laboratório de Ornitologia e Bioacústica, da Universidade Federal de Uberlândia, pelo empréstimo dos materiais de campo, e ao Laboratório de Malária, da Universidade Federal de Minas Gerais, coordenado pela professora, Dra. Erika Braga, que concedeu espaço, tempo e dinheiro para que eu pudesse fazer minhas análises moleculares. Por fim, a você leitor, que investirá tempo de sua vida na leitura desse trabalho.**

## ÍNDICE

<b>RESUMO-----</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT-----</b>	<b>ix</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO-----</b>	<b>1</b>
<b>2.0 MATERIAL E MÉTODOS-----</b>	<b>4</b>
<b>2.1 ÁREAS DE ESTUDO-----</b>	<b>4</b>
<b>2.2 CAPTURA DE INDIVÍDUOS DE AVES E COLETA DE DADOS E         AMOSTRAS DE SANGUE-----</b>	<b>4</b>
<b>2.3 HEMATOLOGIA, DETECÇÃO DE HAEMOSPORIDEOS, MICROSCOPIA E         PARASITEMIA-----</b>	<b>5</b>
<b>2.4 CÁLCULO DO ÍNDICE DE CONDIÇÃO CORPORAL: ÍNDICE DE MASSA         ESCALAR E DE FULTON-----</b>	<b>8</b>
<b>2.5 DETERMINAÇÃO DA COLORAÇÃO DA PLUMAGEM-----</b>	<b>9</b>
<b>2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA-----</b>	<b>10</b>
<b>3.0 RESULTADOS-----</b>	<b>12</b>
<b>4.0 DISCUSSÃO-----</b>	<b>18</b>
<b>5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>24</b>

## RESUMO

PENHA, V. A. S. 2017. Ecologia da interação parasito-hospedeiro: efeito da malária sobre a coloração por carotenoides na plumagem e condição corporal de aves em área de Cerrado. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais. 42 páginas.

Parasitos causadores de malária e Aves tem sido um sistema modelo de estudo da relação parasito-hospedeiro, sendo uma das razões a coleta dos parasitos poder ser realizada sem causar danos à população hospedeira. Infecções crônicas, com baixa parasitemia, podem causar danos aos hospedeiros, já que seria alocada uma maior quantidade de recursos (energia) para o sistema imunológico, diminuindo a massa corporal. O índice de condição corporal é utilizado para caracterizar o estado nutricional do indivíduo. Além de poder afetar a condição corporal, parasitos podem influenciar também na coloração de carotenoides da plumagem de Aves, já que carotenoides são obtidos por meio da dieta, dependendo da capacidade para forragear. O principal objetivo desse estudo foi medir os efeitos de parasitos causadores de malária na condição corporal e na coloração da plumagem peitoral de aves em área de na Cerrado na Reserva do Clube Caça e Pesca Itororó, no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Indivíduos foram capturados usando redes de neblina. Os parasitos foram identificados através de microscopia e PCR aninhado. A coloração foi determinada pela reflectância usando um aparelho de espectrofotômetro portátil, gerando as variáveis: croma de carotenoide; croma/saturação; matiz. As análises foram feitas usando modelo linear generalizado misto, com a parasitemia e/ou presença/ausência de parasitos como variável explicativa e ambos índices de condição corporal e variáveis de coloração como variáveis respostas. Como foram coletados dados de várias espécies de aves, a identidade de cada uma foi colocada como o fator aleatório nos modelos. Os resultados mostraram que os indivíduos parasitados tiveram menores concentrações de croma de carotenoides e penas peitorais menos saturadas quando comparados com indivíduos não infectados. Isso indica, portanto, um *trade-off* entre deposição de carotenoides para coloração de plumagem e para resposta imune, uma vez que os carotenoides também são utilizados como estimuladores do sistema imune. Nem a presença de parasitos, nem a proporção de células infectadas explicou diferenças nos índices de condição corporal. Como fêmeas discriminam possivelmente diferenças na saturação de carotenoides e preferem machos mais saturados, os resultados sugerem a influência negativa direta de parasitos causadores de malária na seleção sexual das populações de aves em área de Cerrado.

Palavras-chave: *Plasmodium*; *Haemoproteus*; Seleção sexual; Coloração por carotenoides; *Elaenia chiriquensis*, *Lanio cucullatus*, *Turdus amaurochalinus*; Índice de Fulton; Índice de massa escalar.

## ABSTRACT

PENHA, V. A. S. 2017. Ecology of host-parasite interaction: malaria impacts on sexual ornaments and survival of birds in Cerrado. Master's Dissertation in Ecology and Conservation of Natural Resources. Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais. 42 pages.

Malaria parasites and birds have been a model study system of parasite-host interaction, being one of the reasons the parasite collection can be performed without causing damage to the host population. Chronic infections, with low parasitemia, can cause damage to the hosts, since it would be allocated a greater amount of resources (energy) to the immune system, reducing body mass. The body condition index is used to characterize one individual's nutritional status. In addition to being able to affect body condition, parasites can also influence the carotenoid coloration of birds' plumage, since carotenoids are obtained through diet, depending on the ability to forage. The main objective of this study was to measure the effects of malaria parasites on body condition and carotenoid coloration of pectoral plumage of birds in a Cerrado's area in the Clube do Caça e Pesca Itororó's Reserve, in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Individuals were captured using mist nets. The parasites were identified by microscopy and nested PCR. The plumage coloration was determined by reflectance using a portable spectrophotometer, generating the following variables: carotenoid chroma; chroma/saturation and hue. The analyzes were done using generalized linear mixed model, with parasitemia and/or presence/absence of parasites as explanatory variable and both body condition indices and coloration variables as response. As data were collected from several bird species, the identity of each was placed as the random factor in the models. The results showed that the parasitized individuals had lower concentrations of chroma of carotenoids and less saturated pectoral feathers when compared with uninfected individuals. This indicates, therefore, a trade-off between carotenoid deposition for plumage coloration and for immune response, since carotenoids are also used as immune system stimulators. Neither the presence of parasites nor the proportion of infected cells explained differences in body condition indexes. As female birds possibly discriminate differences in carotenoid saturation and prefer more saturated males, the results suggest the direct negative influence of parasites that cause malaria in the sexual selection of the bird populations in a Cerrado's area.

Keywords: *Plasmodium*; *Haemoproteus*; Sexual selection; Carotenoid coloration; *Elaenia chiriquensis*, *Lanius cucullatus*, *Turdus amaurochalinus*; Fulton's Index; Scale mass index.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas têm grande influência na dinâmica e evolução de populações de hospedeiros (Lachish et al., 2011), promovendo variação genética e influenciando processos coevolutivos (Poulin et al., 2000). Parasitos podem causar danos aos hospedeiros, como regular (Albon et al., 2002) e influenciar ciclos (Hudson et al., 1998), além de limitar resistência e viabilidade de populações (McCallum et al., 2009). Parasitos causadores de malária (Ordem Haemosporida e genêros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) e Aves têm sido usadas como sistema modelo para investigar o papel de parasitos na evolução da história de vida dos hospedeiros (Ricklefs & Outlaw, 2010), sendo uma das razões, os parasitos poderem ser coletados sem danos à população hospedeira (Marzal et al., 2008). Valkiunas (2005) mostrou que existem cinco principais fases durante a infecção por parasitos causadores de malária: fase prepatente (quando o parasito desenvolve-se fora do tecido sanguíneo); fase aguda (caracterizada pela aparição do parasito na corrente sanguínea, com aumento da parasitemia – proporção de células parasitadas em um único indivíduo); fase de crise (pico de parasitemia); fase crônica (quando há decréscimo da parasitemia) e a fase latente (diminuição brusca da parasitemia, sendo que o parasito pode ser eliminado pela ação do sistema imune do hospedeiro). Os estágios agudo e de crise são as fases de maior possibilidade de detecção dos parasitos por microscopia, já que há maior parasitemia.

A maioria dos indivíduos usados em estudos são sobreviventes da fase aguda, com baixa parasitemia, ou seja, estão na fase crônica da infecção (Valkiunas, 2005). Infecções em fase crônica também podem causar redução do sucesso reprodutivo (Tomás et al., 2007) e afetar a condição corporal (Valkiunas et al., 2006), já que a infecção é acompanhada pelo aumento de alocação de recursos para a resposta imune (Ardia, 2005). A alocação de recursos, como energia, para o sistema imunológico deve diminuir a massa corpórea,

reduzindo a condição corporal, que é a energia acumulada no corpo como resultado da alimentação, que assume-se ser um indicador de saúde do indivíduo (Peig & Green, 2009).

Figueroa et al. (1999) em um estudo feito na Espanha com *Emberiza cirlus* (Passeriformes: Emberizidae), notaram que indivíduos parasitados por *Leucocytozoon cambournaci*, um gênero causador de malária aviária, tiveram menor condição corporal, caracterizando um efeito negativo de parasitos sobre hospedeiros.

A condição corporal pode ser medida por índices de condição corporal, medidos através da relação entre a massa e uma medida de comprimento fixa, como o comprimento do tarso de aves (Peig and Green 2009). Askanas (2008) em um experimento que relacionou um índice de condição corporal com a parasitemia de Aves, no Canadá, demonstrou que houve uma relação negativa e significativa entre a média do número de hematozoários (*Plasmodium* e *Leucocytozoon*, causadores de malária em aves) e a média do índice de massa escalar. Parasitos causadores de malária, além de influenciarem na condição corporal, podem influenciar na coloração da plumagem, que é um sinal de status da saúde e resistência parasitária (Hamilton & Zuk, 1982).

A deposição de carotenoides em plumagens é muito comum em Aves (Hörak et al., 2001), resultando em uma coloração amarelada, avermelhada e/ou alaranjada nas penas. Carotenoides são produzidos apenas por bactérias, plantas, fungos e algas, podendo ser obtidos por animais por meio da dieta (Olson e Owens, 1998). Somente indivíduos com alta resistência a parasitos e maior capacidade para forragear, são capazes de ser intensamente coloridos sem comprometer a quantidade de carotenoides alocados para outras funções fisiológicas (Hamilton & Zuk, 1982). Isso ocorre porque os carotenoides são utilizados como antioxidantes específicos e para atividades imunoestimuladoras (Moller et al., 2000). Hörak et al. (2001), em um estudo feito na Estônia com *Parus major* (Passeriformes: Paridae), observaram efeito negativo de parasitos na coloração da plumagem por carotenoides, sendo

que as aves parasitadas tinham coloração com matiz diferentes, sendo menos conspícuas que aves não parasitadas.

As perguntas desse estudo foram: há efeitos de parasitos causadores de malária na coloração de plumagens por carotenoides e na condição corporal de aves?; ambas condição corporal e coloração de plumagem podem predizer sobre o status de saúde de indivíduos? A primeira hipótese foi de que há um efeito negativo do parasitismo na condição corporal e coloração de plumagem das aves; assume-se que os indivíduos parasitados devam apresentar menor índice de condição corporal, já que alocam mais energia em resposta imune e menos em reserva energética (Hamilton & Zuk, 1982). Espera-se também que indivíduos parasitados tenham penas peitorais coloridas por carotenoides com colorações menos saturadas quando comparados com indivíduos não parasitados. A segunda hipótese foi que houvesse uma relação positiva entre ambos índice de condição corporal e coloração de plumagem por carotenoides em aves. Esperou-se que ambas tivessem correlação positiva, já que indivíduos capazes de forragear conseguiram manter-se em com plumagens com maiores saturações e com maiores índices de condição corporal. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram determinar se há relação entre parasitos causadores de malária na condição corporal e coloração da plumagem de aves, assim como relacionar os índices de condição corporal com variáveis de coloração de plumagem, ambos indicadores de saúde dos indivíduos, em uma reserva do Bioma Cerrado, no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

## 2.0 MATERIAIS E MÉTODO:

### 2.1 ÁREAS DE ESTUDO:

Foi realizada uma pesquisa exploratória, a partir de registros visuais e auditivos, nas seguintes áreas para determinar a presença de Aves com coloração por carotenoides: Reserva de Cerrado do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, Fazenda Agua limpa e Campus Glória, estes dois últimos pertencentes à Universidade Federal de Uberlândia. A Reserva de Cerrado do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia, com 640 hectares e localizada em acesso ao final da Avenida Nicomedes Alves dos Santos, no setor sul do município de Uberlândia, entre as coordenadas 18° 59' S e 48° 18' W, foi escolhida, já que fora o local com maior quantidade de aves para a realização do estudo. Essa área é caracterizada pelo clima tropical sazonal, com temperaturas anuais médias de 22° C, elevação de 863 m, e precipitação anual média de 1500 mm (Bachtold et al., 2012). A reserva tem dominação de fitofisionomia de Cerrado *sensu strictu* (Oliveira & Marquis, 2002), com árvores entre 2 e 8 m de altura espalhadas com um sub-bosque dominado por gramíneas (Oliveira-Filho & Ratter, 2002).

### 2.2 CAPTURA DE INDIVÍDUOS DE AVES E COLETA DE DADOS E AMOSTRAS DE SANGUE:

Indivíduos de aves de diferentes espécies de aves passeriformes foram capturados utilizando dez redes de neblina com malha de 36 mm, 12 m de comprimento por 2,5 m de altura. As redes foram abertas e a captura conduzida entre 5 h e 12 h, de fevereiro a abril de 2016, após a obtenção de todas as licenças do CEMAVE/IBAMA (4064-1) e SISBIO (51261-1). Totalizando 40 dias de campo e 280 h de esforço amostral. Espécie, peso e comprimento

do tarso direito foram registrados de cada indivíduo capturado. Todos os indivíduos capturados foram anilhados de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Centro de Pesquisas para Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/IBAMA). Após o anilhamento e obtenção de medidas morfométricas, foi coletada uma amostra sanguínea da veia braquial de cada indivíduo, contendo aproximadamente  $50 \mu L$  de sangue, para análise molecular de parasitos. Logo após a coleta, uma porção da amostra foi utilizada para preparar três lâminas de esfregaços sanguíneos. O restante da amostra foi preservada em etanol absoluto. As lâminas foram secas em campo e, em laboratório, foram fixadas e coradas (detalhes a seguir). Para a análise de coloração de carotenoides, foram coletadas entre cinco e seis penas logo abaixo da fúrcula de todos os indivíduos, as quais conservadas dentro de um microtubo para posterior análise. Após a coleta de dados e amostras, todos os indivíduos foram liberados no mesmo ambiente em que foram capturados.

### 2.3 HEMATOLOGIA, DETECÇÃO DE HAEMOSPORIDEOS E MICROSCOPIA:

As lâminas foram fixadas por imersão em metanol 100% durante um minuto, e em seguida, foram secas ao ar livre. Seguindo o protocolo de Valkiunas (2005), as lâminas foram imersas em corante Giemsa durante uma hora, e lavadas em água corrente e colocadas para secar ao ar livre. As lâminas coradas foram examinadas em microscópio em aumento de 100x em óleo de imersão, analisando 100 campos por lâmina. Em cada campo foram registradas a quantidade de células vermelhas e a presença de parasitos dentro delas. O número total de eritrócitos infectados foi calculado com base no número registrado de eritrócitos (200 por campo estimados), mas usando regra de três com base no número de parasitas presentes em dez mil hemácias (Valkiunas, 2005).

Para a identificar a presença e a respectiva linhagem dos parasitos, foram adicionados 250 µL de tampão de lise (proteínase K) às amostras em álcool, coletadas em campo, e deixadas em banho maria (60°C) por 18 horas. Em seguida, os microtubos foram agitados em vórtex por 15 segundo e depois centrifugados por 20 segundos a 14000 rpm. Foram adicionados 125 µL de fenol (pipetando-se a fase do fundo) e depois 125 µL de clorofórmio para solubilizar as proteínas. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14000 rpm. A fase sobrenadante foi pipetada e depositada em outro novo microtubo devidamente identificado, descartando os tubos com fenol-clorofórmio em local apropriado. Foram adicionados, ao novo microtubo, 300 µL de clorofórmio-álcool-isoamílico 1:24, invertendo-os cuidadosamente, e, depois, centrifugando por 5 minutos a 14000 rpm. A parte inferior foi pipetada e descartada em local apropriado e depois foram adicionados 300 µL de clorofórmio, centrifugando novamente por 5 minutos a 14000 rpm. Após retirar da centrifuga, a fase inferior foi novamente pipetada e descartada em local apropriado. Assim, foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado e depois as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 rpm. Após os vinte minutos, os tubos foram abertos e a parte líquida foi descartada em local apropriado. O mesmo procedimento foi feito adicionando 600 µL de etanol 70%. Após retirada da centrifuga e descarte da parte líquida, as amostras foram deixadas em estufa por 40 minutos para secagem do microtubo. Por fim, foram adicionados 30 µL de água milli-q, para suspender o DNA, e as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até análise.

Para a detecção molecular, o DNA extraído foi examinado para a presença de infecções de *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus* por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando iniciadores 343F (59GCTCACGCATCGCTTCT39) e 496R (59GACCGGTCATTTCTTG39), com base no protocolo descrito por Fallon et al. (2003). Usando gel de acrilamida, uma banda de 195 pb foi testada para a presença dos parasitos

causadores de malária. Um fragmento de 524 pb do citocromo b do gene mitocondrial dos indivíduos infectados foi amplificado por PCR aninhado utilizando os iniciadores HaemNFI (CATATATTAAGAGAAITATGGAG) e HaemNR3 (GCATTATCTGGATGTGA) na primeira amplificação e HaemF (ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC) e HaemR2 (ATGGTGCTTCGATATGCATG) e HaemR2 (GCATTATCTGGATGTGA TAATGGT) na segunda, seguindo o protocolo de Helgreen et al. (2004). Após a amplificação, o resultado da PCR foi purificado com polietileno-glicol 8.000 20% e 2,5 M de NaCl, seguindo o protocolo de Sambrook et al. (2001). Os produtos de PCR foram, em seguida, sequenciados usando o método de sequenciamento DNA de Sanger et al. (1977). Para eletroforese, foi utilizado uma plataforma ABI3730 (Life Technology/Thermo Fisher Scientific), pela Myleus<sup>R</sup> (Belo Horizonte, MG, Brasil). Sequências foram organizadas e avaliadas mediante a qualidade, seguindo o protocolo de Green (1994), e os conjuntos de cromatogramas foram investigados usando o protocolo de Gordon et al. (1998). As sequências foram analisadas em computador usando o programa ChromasPro Versão 2.6, e comparadas com a base de dados de MalAvi (Bensch et al., 2009), e em seguida, as sequências foram depositadas no GenBank. Devido a fraca banda durante a execução da segunda reação segundo Helgreen et al. (2004), somente cinco indivíduos parasitados puderam ser identificados quanto a linhagem, sendo duas linhagens de *Plasmodium* e duas linhagens de *Haemoproteus*. Por esse motivo, análise em relação a identidade dos parasitos não foi incluída.

## 2.4 CÁLCULO DO ÍNDICE DE CONDIÇÃO CORPORAL: ÍNDICE DE MASSA ESCALAR E DE FULTON:

O índice de condição corporal de massa escalar foi calculado pela seguinte equação:

$\hat{\mu}_i = \mu_i \left[ \frac{L_o}{L_i} \right]^{bSMA}$  (Peig & Green 2009), em que  $\mu_i$  e  $L_i$  são medidas de massa corporal e comprimento de um indivíduo  $i$ , respectivamente;  $L_o$  é um valor arbitrário de  $L$ , como por exemplo a média aritmética do valor de comprimento do tarso direito da população estudada; e  $\hat{\mu}_i$  é a massa corporal prevista para o indivíduo  $i$  quando a medida de comprimento corporal é padronizada em  $L_o$ ;  $bSMA$  é o expoente escalar estimado por uma regressão SMA da massa corporal ( $\mu_i$ ) pelo comprimento corporal ( $L_i$ ). A regressão SMA é um erro no modelo das variáveis que melhor considera a interdependência da massa corporal pelo comprimento (Peig & Green, 2009). Para cada espécie o valor de  $bSMA$  retira qualquer efeito de confusão do crescimento da espécie, e ainda fica em concordância com a teoria do dimensionamento de expoentes de Green (2001). O expoente  $bSMA$  foi calculado indiretamente ao dividir o declive de uma regressão dos quadrados mínimos ordinários (OLS) da massa corporal pelo comprimento corporal (já que são medidas proximamente correlacionáveis) e ao dividir o declive pelo coeficiente de correlação de Pearson. O índice de massa escalar, por levar em consideração o coeficiente  $bSMA$ , não pode ser calculado para espécies com quantidade menor que quatro indivíduos, sendo calculado somente para as espécies com número de indivíduos superiores a quatro. Então, foi calculado outro índice, o índice de Fulton, incluindo todos os indivíduos de todas as espécies, independentemente da quantidade de indivíduos por espécie. O índice de Fulton é calculado a partir da seguinte fórmula:  $K = M/L^3$ , em que  $K$  é o valor do índice,  $M$  é a massa corporal e  $L$  o comprimento corporal. O expoente três assume um crescimento isométrico, em que a relação peso e comprimento deve ser próxima a três (Peig & Green, 2010). A massa corporal se relaciona à quantidade de gordura armazenada,

considerando que, entre indivíduos de uma mesma população, sejam comparáveis o tamanho, a massa do conteúdo estomacal, a massa muscular e o estado de hidratação (Labocha & Hayes, 2011). Assim, foi gerado um índice para todos os indivíduos, mas analisados separadamente.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DA COLORAÇÃO DA PLUMAGEM:

As penas guardadas em microtubo foram retiradas e colocadas em folha com plano escuro, previamente testada, com indicação de cor preta e sem registros de ultravioleta. Foi utilizado um espectrofotômetro portátil de medição de reflectância (USB4000; Ocean Optics), e retirada uma medida com as penas sobrepostas no plano escuro, usando o programa Spectrasuite 12.2 (Ocean Optics). As medições do espectrofotômetro geraram medições de reflectâncias que foram restringidas entre os comprimentos de onda 300 até 700 nanômetros, sendo ranqueada de um a um nanômetro, para a geração das curvas de reflectância para cada indivíduo. Foi utilizado o pacote Pavo do programa R (R core team, 2016, <http://www.R-project.org/>) para a realização das análises. A média das curvas de reflectância foi suavizada para uma curva do tipo 0.2 para todos os indivíduos, e a partir dessa foram geradas as variáveis colorimétricas utilizadas na análise. Como só foram capturados indivíduos de coloração por carotenoides amarelos e vermelhos, as análises só foram feitas para essas cores (ver próxima sessão para mais informações). A média de reflectância de todos os indivíduos obtiveram picos de reflectância entre os comprimentos de onda 300 a 450 nanômetros, indicando presença de coloração por ultravioleta. Por esse motivo, a variável, pico de reflectância em ultravioleta (S1.UV) foi incluída nas análises.

Como o sistema visual de aves é tetracromático, contendo comprimentos de ondas curtas (s), médias (n), longas (l) e ultravioletas (uv) (Cuthill, 2006), foi gerada um modelo

específico para aves, formando um tetraedro com três dimensões de um plano cartesiano (planos X, Y e Z). A partir desse sistema, foram feitos pontos, com medidas euclidianas, utilizando os valores de reflectância gerados de cada indivíduo, partindo do ponto de origem acromático (Endler & Mielke, 2005). Assim, as variáveis utilizadas no modelo foram a saturação e matiz (Saks et al. 2003). A saturação é um ponto que esta entre o ponto de origem acromático e a coloração que ele representa. Se o indivíduo tivesse concentrações de carotenoides suficientes para ter uma saturação máxima, esse ponto seria o maior possível. Por esse motivo, cada indivíduo tem a saturação alcançada, que é o ponto dividido pelo ponto máximo possível. A matiz, no modelo, é dividida em dois ângulos, já que o tetraedro é um plano cartesiano de três dimensões, sendo  $\theta$  um ângulo horizontal, azimute a partir do eixo X positivo até o ponto R alcançado, já o ângulo  $\phi$  é vertical, sendo um ângulo de elevação do plano X-Y até o ponto R alcançado, seguindo o protocolo de Endler & Mielke (2005). Já o croma do carotenoide, outra variável utilizada na análise, é uma variável colorimétrica, sem relação direta com o modelo do sistema visual de aves, que é calculado seguindo a equação:  $\frac{R\ 700 - R\ 450}{R\ 700}$ , sendo que R 700 é o valor máximo de reflectância no ponto do espectro em 700 e R 450 é o valor de reflectância no ponto em 450. Essa medida é utilizada por ser um estimador espectrofotométrico da concentração real de carotenoide de cada indivíduo (Anderson & Prager, 2006).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Todos os dados foram testados para os pressupostos de normalidade, a partir de histogramas, e transformados quando necessário. Para saber qual variável explicaria melhor o modelo e para estimar sobre a natureza das distribuições das variáveis, foram feitas correlações entre as variáveis colorimétricas e entre as variáveis de condição corporal,

gerando o coeficiente de correlação de Spearman entre cada variável. Para a análise das variáveis de condição corporal, todas as espécies foram incluídas (com exceção de *Nemosia pileata*, *Tangara cayana*, *Cnemotriccus fuscatus*, *Tyrannus melancholicus* e *Cyclarhis gujanensis* para o índice de massa escalar), e para as variáveis colorimétricas, apenas seis com dados de coloração foram analisadas (*Elaenia chiriquensis*, *Myiarchus tyrannulus*, *Myiothlypis flaveola*, *Pitangus sulphuratus*, *Cyclarhis gurjanensis* e *Tyrannus melancholicus*). Foram realizados modelos lineares generalizados mistos (GLMM), com a espécie como fator aleatório. No primeiro modelo a presença/ausência (variável binária) foi colocada como variável explicativa e as variáveis, índice de massa escalar ou índice de Fulton, como resposta. Para análise das variáveis relacionadas à cor, foram realizados vários GLMMs, tendo presença/ausência como variável explicativa de todos os modelos e as variáveis de cor como variáveis resposta (R alcançado,  $\phi$ ,  $\theta$ , croma de carotenoide, ponto máximo de reflectância em ultravioleta). Para toda relação significativa, foram feitos novos GLMMs, mas com parasitemia como variável explicativa. Foi feito também um GLMM entre as variáveis colorimétricas e as variáveis de condição corporal para saber se ambos indicam índices de saúde dos indivíduos.

Para a espécie *Lanius cucullatus*, única com coloração avermelhada, foi feito um modelo linear generalizado (GLM), utilizando somente machos (já que só foram coletadas amostras de penas para machos), com as variáveis de coloração como variável resposta e presença/ausência como variável explicativa. Para aquelas variáveis com nível de significância, foi feito também um GLM tendo como variável explicativa a parasitemia. Para analisar se a presença/ausência de parasitos explicava a variação nos índices de condição corporal, foram feitos outros GLMs, com as variáveis de condição corporal como variável resposta e a presença/ausência de parasitos como variável explicativa, com sexo sendo avaliado como possível variável de interação com a variável explicativa. Para aquelas

variáveis com nível de significância, seguiu-se para a análise de parasitemia. Todas as análises foram feitas usando o programa R (R core team, 2016, <http://www.R-project.org/>).

### 3.0 RESULTADOS

Foram capturados 148 indivíduos, das famílias Furnariidae, Parulidae, Vireonidae, Tyrannidae, Thraupidae e Turdidae (TABELA 1), dentro dos quais 54 indivíduos estavam parasitados com *Plasmodium* ou com *Haemoproteus* (Ordem Haemosporida), com 36,48% de indivíduos infectados por parasitos causadores de malária (FIGURA 1).

Tabela1: Família e espécie dos 148 indivíduos de aves da ordem Passeriformes capturados na reserva do Clube Caça e Pesca Itororó, no município de Uberlândia, Minas Gerais, mostrando a quantidade de indivíduos parasitados por espécie.

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Indivíduos parasitados</b>
Furnariidae	<i>Furnarius rufus</i>	10	1
Parulidae	<i>Myiothlypis flaveola</i>	20	5
Thraupidae	<i>Lanio cucullatus</i>	26	11
	<i>Nemosia pileata</i>	4	3
	<i>Tangara cayana</i>	6	4
Turdidae	<i>Turdus leucomelas</i>	13	6
	<i>Turdus amaurochalinus</i>	23	7
Tyrannidae	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	2	1
	<i>Elaenia chiriquensis</i>	21	8
	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	7	1
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	9	3
	<i>Tyrannus melancholicus</i>	4	2
Vireonidae	<i>Cyclarhis gujanensis</i>	3	2
<b>Total</b>		<b>148</b>	<b>54</b>

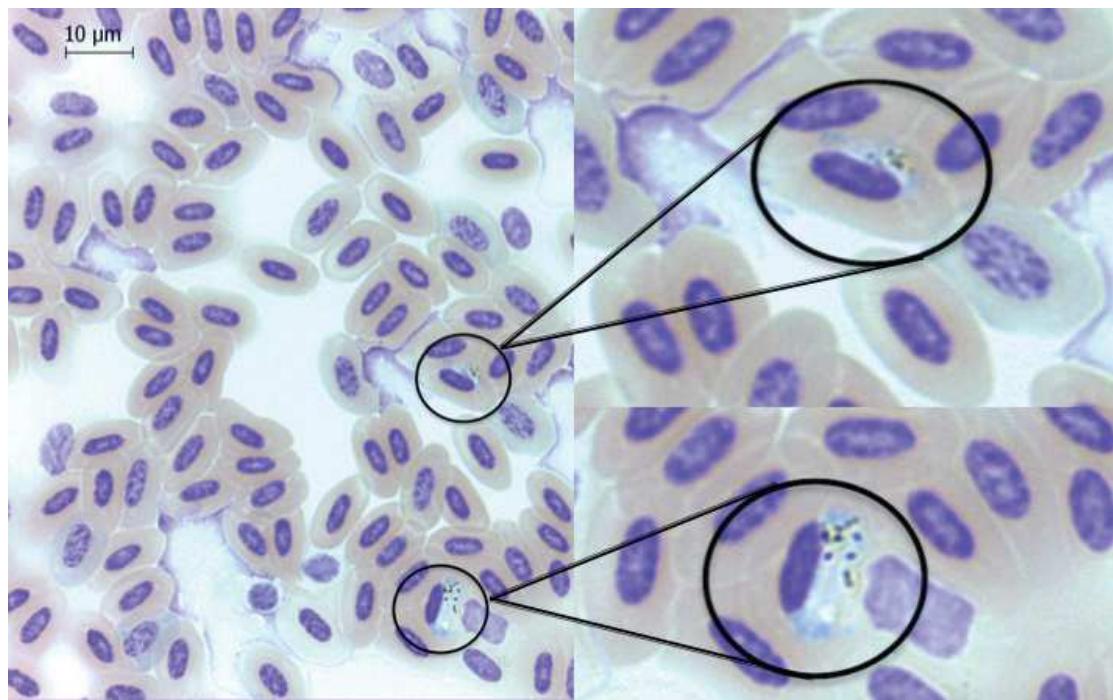


Figura 1: Presença de *Haemoproteus* sp., em aumento 100x sob imersão de óleo, em um indivíduo de *Nemosia pileata* nos locais (ampliados) indicados por um círculo.

Nenhuma das variáveis resposta obtiveram índices de correlação de Spearman suficientemente altos para que alguma delas fosse retirada da análise em detrimento da outra. Não foi encontrada relação entre as variáveis de parasitismo com as variáveis de condição corporal. Quanto aos modelos que relacionaram as variáveis de cor com presença/ausência de parasitos, somente o ponto R alcançado ( $p<0,05$ ;  $R^2=-0,163$ ; Chisq=52,12; GL=1) e croma de carotenoide ( $p<0,05$ ;  $R^2=-0,290$ ; Chisq=30,85; GL=1) foram explicados negativamente pela presença de parasitos. Somente essas duas variáveis foram relacionadas com parasitemia, uma vez que a presença de parasitos explicava a redução dos valores das variáveis de cor. Nos modelos que relacionavam parasitemia com o ponto R alcançado e com croma de carotenoide, somente o primeiro ( $p=0,01$   $R^2=-0,664$ ; Chisq=3,36; GL=1) foi explicado pela parasitemia (TABELA 2). Dessa maneira, para cada aumento de uma unidade na parasitemia, diminui-se 0,02 no ponto R alcançado, explicando 66,4% da variação (FIGURA 2).

Tabela 2: Relações dos modelos lineares generalizados mistos, entre as variáveis resposta (variáveis de cor ou de condição corporal) e as variáveis explicativas (presença/ausência ou parasitemia), com os valores significância (p), variância ( $S^2$ ), desvio padrão (DP), Chisq, grau de liberdade (GL) e  $R^2$ . As relações significativas ( $p < 0,05$ ) estão marcadas em negrito.

<i>Variáveis de cor / Variáveis parasitismo</i>	<i>Presença/Ausência</i>	Parasitemia
Ponto R alcançado	<b>Valor de p &lt; 0,05</b> $S^2 = -0,24$ ; DP= 0,03 $R^2 = -0,16$ Chisq=52,127; GL=1	<b>Valor de p = 0,01</b> $S^2 = -0,02$ ; DP= 0,01 $R^2 = -0,66$ Chisq=3,36; GL=1
Ângulo $\theta$	Valor de p= 0,49 $S^2 = -0,12$ ; DP= 0,17 $R^2 = -0,41$ Chisq=0,46; GL=1	- - - -
Ângulo $\phi$	Valor de p= 0,61 $S^2 = 0,03$ ; DP= 0,06 $R^2 = -0,55$ Chisq=0,25; GL=1	- - - -
Croma de Carotenoide	<b>Valor de p &lt; 0,05</b> $S^2 = -0,34$ ; DP= 0,06 $R^2 = -0,29$ Chisq=30,85; GL=1	Valor de p= 0,24 $S^2 = -0,02$ ; DP= 0,02 $R^2 = -0,88$ Chisq=6,40; GL=1
S1.UV	Valor de p= 0,47 $S^2 = -0,01$ ; DP= 0,01 $R^2 = -0,24$ Chisq=0,50; GL=1	- - - -
<i>Variáveis de Condição Corporal / Variáveis parasitismo</i>	<i>Presença/Ausência</i>	Parasitemia
Índice de massa escalar	Valor de p= 0,17 $S^2 = -2,40$ ; DP= 1,79 $R^2 = -0,05$ Chisq=1,12; GL=1	- - - -
Índice de Fulton	Valor de p= 0,28 $S^2 = -0,11$ ; DP= 0,06 $R^2 = -0,30$ Chisq=1,80; GL=1	- - - -

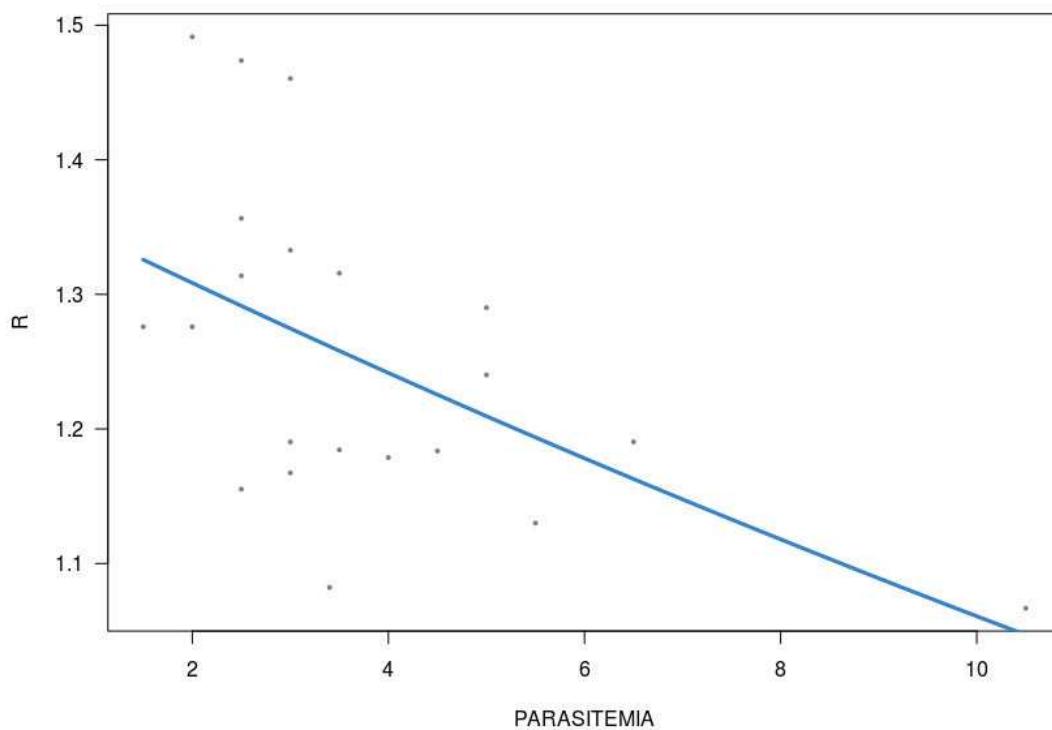


Figura 2: Relação dos indivíduos parasitados de aves de coloração amarela com a parasitemia, mostrando uma correlação negativa.

Quanto aos GLMMs que relacionaram as variáveis de condição corporal com as variáveis de coloração, somente a variável ponto alcançado em R ( $p= 0,04$ ;  $R^2=-0,753$ ; Chisq=4,47; GL=1) e o ângulo  $\theta$  ( $p< 0,05$ ;  $R^2=-0,933$ ; Chisq=0,07; GL=1) tiveram relação com o índice de massa escalar (TABELA 4). Já o índice de Fulton foi relacionado somente com o ponto R alcançado ( $p< 0,05$ ;  $R^2=-0,903$ ; Chisq=4,18; GL=1).

Tabela 4: Resultados dos modelos lineares generalizados mistos entre as variáveis de coloração e as de condição corporal. Os valores de p significativos ( $< 0,05$ ) estão marcados em negrito, juntamente com os valores de variância ( $S^2$ ), desvio padrão (DP), Chisq, grau de liberdade (GL) e  $R^2$ .

<i>Variáveis / Variáveis de cor / de Condição corporal</i>	Índice de Fulton	Índice de massa escalar
Ponto R alcançado	<b>p= 0,03</b> $S^2=0,12$ ; DP=0,06 Chisq=4,47; GL=1 $R^2= -0,903$	<b>p= 0,04</b> $S^2=0,005$ ; DP=0,002 Chisq=4,18; GL=1 $R^2= -0,753$
Croma de carotenoide	p= 0,62 $S^2=-0,04$ ; DP=0,09 Chisq=0,24; GL=1 $R^2= -0,947$	p= 0,23 $S^2=0,004$ ; DP=0,003 Chisq=1,43; GL=1 $R^2= -0,893$
Ângulo $\theta$	p= 0,78 $S^2=0,06$ ; DP=0,22 Chisq=0,07; GL=1 $R^2= -0,963$	<b>p&lt; 0,05</b> $S^2=-0,01$ ; DP=0,005 Chisq=7,63; GL=1 $R^2= -0,933$
Ângulo $\phi$	p= 0,70 $S^2=0,02$ ; DP=0,07 Chisq=0,13; GL=1 $R^2= -0,982$	p= 0,82 $S^2=-0,004$ ; DP=0,002 Chisq=0,04; GL=1 $R^2= -0,934$
S1.UV	p= 0,43 $S^2=0,02$ ; DP=0,02 Chisq=0,60; GL=1 $R^2= -0,729$	p= 0,71 $S^2=0,002$ ; DP=0,001 Chisq=0,13; GL=1 $R^2= -0,853$

Para *Lanio cucullatus*, a variável presença/ausência de parasito não explicou a variação em condição corporal, mas foram explicadas pelo sexo ( $p< 0,05$ ;  $R^2=0,41$ ; Chisq=0,66; GL=1 para o índice de Fulton;  $p< 0,05$ ; Chisq=385,84;  $R^2=0,53$ ; GL=1 para o índice de massa escalar), com machos tendo, em média, maiores índices de Fulton e de massa escalar que fêmeas. Já para as análises de coloração, os modelos lineares generalizados (GLM) mostraram relação somente para as variáveis ponto R alcançado ( $p< 0,05$ ;  $R^2=0,61$ ; Chisq=0,37; GL=1) e croma de carotenoide ( $p<0,05$ ;  $R^2=0,65$ ; Chisq=1,42; GL=1) com a presença/ausência de parasitos. A parasitemia também explicou negativamente a variação em ambas variáveis de coloração, ponto R alcançado ( $p< 0,05$ ;  $R^2=0,50$ ; Chisq=0,31; GL=1) e croma de carotenoide ( $p< 0,05$ ;  $R^2=0,4887$ ; Chisq=1,09; GL=1). Sendo que, para cada

aumento de uma unidade de parasitos, o R diminuiria 0,14, com explicação de 41,65% (Figura 3).

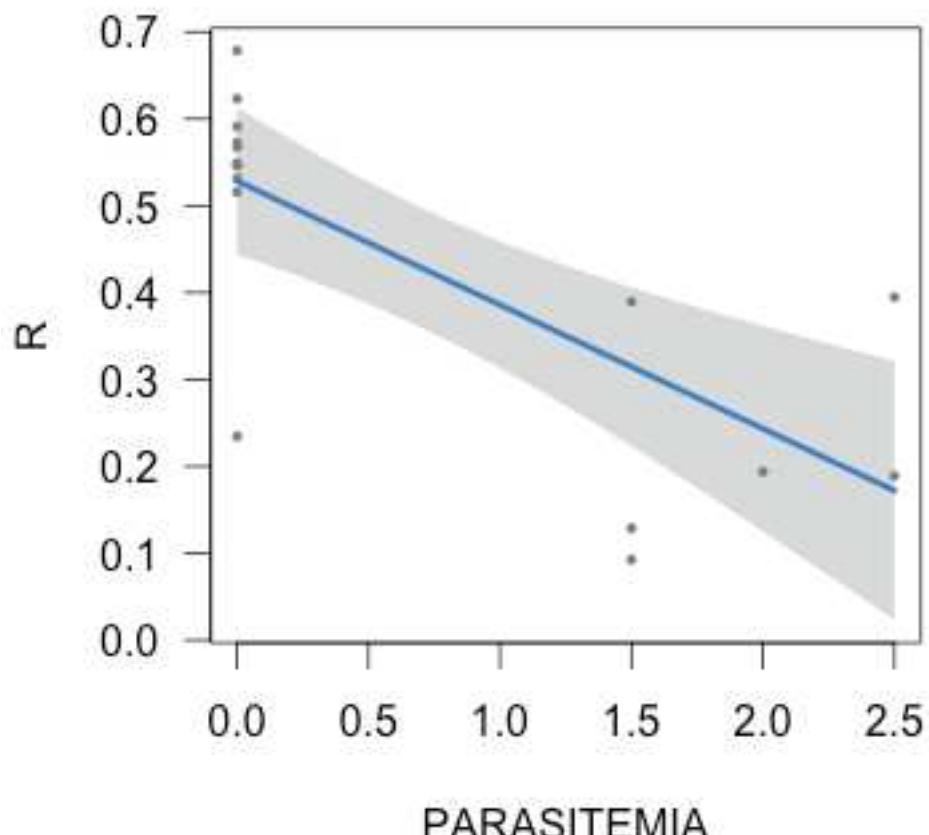


Figura 3: Relação negativa entre Parasitemia e ponto R alcançado contendo somente indivíduos da espécie *Lanio cucullatus*.

#### 4.0 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos de parasitos causadores de malária em coloração por carotenoides e em índices de condição corporal. Coloração por carotenoides tem sido considerada como indicador de saúde de indivíduos (Hill et al., 2009), assim como índices de condição corporal, que são medidos através da relação entre massa corporal e alguma medida estrutural do corpo, como o tarso de uma ave (Peig & Green, 2009). Os resultados revelaram uma correlação negativa entre dois índices de condição corporal e uma medida de carotenoide depositadas em plumagens de aves (ponto R alcançado e ângulo  $\theta$ ). É possível propor que há um *trade-off* entre o investimento em reserva energética e aparentar-se mais saturado mediante a coloração por carotenoides. Carotenoides são relativamente escassos em alimentos e espécies coloridas de aves tem custos envolvidos em termos de energia, principalmente pelo tempo gasto procurando por recursos alimentares (Simons et al., 2012). No presente estudo, houve relação negativa entre índices de condição corporal e variáveis de coloração de plumagem para espécies tanto com coloração amarelada quanto avermelhada, como em *Lanius cucullatus*. Os ornamentos vermelhos são, em geral, resultados da biotransformação do hidrocarotenoide amarelo em keto-carotenoide vermelho (McGraw, 2006). Esse processo requer reações de hidrogenação e oxidação (de Blas et al., 2016). O status oxidativo dos indivíduos de aves influencia na atividade de enzimas responsáveis por processos oxidativos e de hidrogenação, indicando a capacidade do indivíduo em lidar com o estresse oxidativo, ligado à transformação de carotenoides (Johnson & Hill, 2013). Estudando a biotransformação de carotenoides em *Alectoris rufa* (Galliformes: Phasianidae), na Espanha, de Blas et al. (2016) viu que quanto maior a produção de cor, maior é o estresse oxidativo. Assim, se carotenoides podem ser obtidos somente pela dieta (McGraw, 2006), há custos relacionados para a biotransformação e para a busca. Aqueles indivíduos que investem na produção de plumagem com coloração de carotenoides não apresentam altos índices de condição corporal. Negro et

al. (2001), estudando a relação dos pigmentos carotenoides e condição em *Anser anser* (Anseriformes: Anatidae), na Espanha, identificaram uma correlação negativa entre a concentração total de carotenoides e a condição corporal, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Outro fator importante a ser analisado, é que carotenoides, além de serem utilizados para sinalização em plumagens, são utilizados como reserva energética, e quando estão no tecido adiposo, não tornam-se prontamente disponíveis para outras funções (Hill et al., 2002). Negro et al. (2011) também mostraram que há grandes quantidades de carotenoides em reservas energéticas de gansos. Já Metzger & Bairlein (2011) estudando a relação de carotenoides obtidos pela dieta e a reserva energética em *Sylvia borin* (Passeriformes: Sylviidae), na Alemanha, observaram que a saturação de gordura subcutânea aumenta com a suplementação por carotenoides. Dessa maneira, quando há demanda energética para atividades relacionadas à manutenção individual, os carotenoides tendem a permanecer em reservas energéticas, explicando a correlação negativa entre índices de condição corporal e coloração por carotenoides encontradas no presente estudo. A hipótese de que ambas variáveis sejam correlacionadas positivamente para indicar saúde dos indivíduos não foi corroborada, uma vez que ambas são custosas energeticamente. Como também, a utilização de carotenoides como reserva energética, aumenta o desbalanço para a utilização em plumagens.

Além da importância de carotenoides como fator para reserva energética e a sinalização em plumagem de aves, esses elementos também são importantes para a resposta imune (Lozano, 1994). No presente estudo foi encontrada uma relação linear e negativa entre o quanto saturado um indivíduo é e a proporção de eritrócitos infectados por parasitos causadores de malária. Em aves, novamente um *trade-off* entre investimento em estruturas ornamentais por carotenoides e funções relacionadas a manutenção individual tem sido proposto (Møller et al. 2000). Aqueles indivíduos que apresentam mais carotenoides nos

tegumentos, o fazem por que (a) ingerem mais carotenoides obtidos pela dieta (Goodwin 1984), (b) a constituição genética desses indivíduos para a absorção de carotenoides é mais eficiente, e/ou (c) estão livres de parasitos e doenças, e, por esse motivo, não necessitam desviar a obtenção de carotenoides para funções não ornamentais (Surai & Speake, 2001). McGraw & Ardia (2003), estudando a relação entre pigmentos carotenoides, função imune e coloração sexual em *Taeniopygia guttata* (Passeriformes: Estrildidae), nos Estados Unidos, viram que machos com maiores dietas naturais de sementes com carotenoides, obtiveram maior concentração de carotenoides circulantes no sangue, e desenvolveram colorações mais saturadas no bico. Esses machos analisados também mostraram respostas imunes mediadas por células e respostas imunes humorais significativamente maiores, quando comparados a indivíduos que não tinha as mesmas quantidades na dieta. Fenoglio et al (2002) estudando a relação do sistema imune e a carotenoides em *Gallinula chloropus* (Gruiformes: Rallidae), na Itália, também mostraram um aumento da imunidade mediada por células como resultado da suplementação por carotenoides. Assim, o *trade-off* entre ornamentação por carotenoides e imunocompetência mostra que ao montar uma resposta imune, há custos relacionados à quantidade de carotenoides disponíveis para outras funções. Dessa maneira, indivíduos parasitados, ao ingerirem carotenoides, precisam direcionar a utilização desses pigmentos para a resposta imune, e não para coloração, reserva energética e condição corporal, o que explica a relação negativa encontrada no presente estudo. Como consequência, o parasitismo faz com que indivíduos aparentem menos saturados para outros indivíduos de aves, já que alocam carotenoides para requerimentos de manutenção individual. Aguilera & Amat (2007), estudando tal relação em *Carduelis chloris* (Passeriformes: Fringillidae), na Espanha, viram que houve uma redução de 25% de carotenoide plasmático, quando comparados a indivíduos controles, sem estresse imune. Esse fato também se relaciona com os resultados encontrados no presente trabalho, em que também mostrou uma relação linear e negativa entre o croma de

carotenoides, estimador espectrofotométrico da concentração real de carotenoide de cada indivíduo (Anderson & Prager, 2006), com a presença de parasitos. Indivíduos parasitados, tiveram, portanto, possivelmente menor eficiência para adquirirem recursos ricos em carotenoides, investiram mais em resposta imune e exibiriam uma plumagem menos saturada e com menor concentração de carotenoides depositados nas penas. Ornamentos baseados em carotenoides possibilitam indivíduos a sinalizarem o status de saúde passado e presente, a partir do quanto saturados estão (ponto R alcançado). No entanto, carotenoides só podem ser alocados para sinalização se não estiverem sendo usados para outros fatores (Sepp et al., 2011), como mostram os resultados do atual estudo. Assim, aves, ao serem eficientes em mostrar uma plumagem conspícuia durante a muda, mostram status de saúde maior no próximo período reprodutivo (del Cerro et al., 2010), considerando que a maioria das infecções por malária são crônicas (Valkiūnas, 2005), o que influencia na seleção sexual de machos (Alonso-Alvarez et al., 2004).

Estudos observacionais e experimentais apontam que fêmeas de aves preferem machos com colorações mais intensas de plumagem do que indivíduos menos intensamente coloridos (Pike et al., 2007). MacDougall & Montgomerie, (2003) estudando a relação de carotenoides e preferência de fêmeas em *Carduelis tristis* (Passeriformes: Fringillidae), no Canadá, observaram que fêmeas preferiram machos que tinham mais acesso a carotenoides, e tinham coloração por carotenoides mais saturadas. Assim, machos que conseguem produzir ornamentos mais elaborados de carotenoides estão sinalizando suas habilidades em resistir a parasitos, doenças e estresse oxidativo, vivendo, portanto, maior tempo quando comparado a indivíduos que não correspondem com essas perspectivas. Os resultados de MacDougall & Montgomerie, (2003) vão de acordo com a hipótese da seleção sexual mediada por parasitos, que diz que fêmeas se beneficiariam ao associar-se com machos mais intensamente coloridos, não por serem forrageadores mais eficientes ou por que são imunocompetentes, mas sim, por

que tem um genoma adaptado a resistência parasitária, que pode ser herdada a descendentes (Hamilton & Zuk, 1982), podendo, inclusive, direcionar o uso de carotenoides ornamentos sexuais sem ter efeitos negativos sob o sistema imune (von Schantz et al., 1999). No presente estudo, aves parasitadas tiveram menor concentração de carotenoides depositadas nas penas e, por sua vez, plumagem menos saturadas. Toomey & McGraw (2012), estudando preferencia de fêmeas em machos com coloração por carotenoides em *Haemorhous mexicanus* (Passeriformes: Fringillidae), nos Estados Unidos, notaram que fêmeas conseguiam discriminar machos com colorações correspondentes a concentrações diferentes de carotenoide plasmático. Dessa maneira, os estudos de Toomey & McGraw e MacDougall & Montgomerie, (2003) mostram que fêmeas conseguem não só discriminar diferentes saturações de carotenoides como também preferem machos com maiores saturações. Futuros estudos poderiam explorar a preferencia e discriminação para cada espécie analisada no presente estudo, para ver, se fêmeas prefeririam machos com plumagem mais saturada e com maior concentração de carotenoide. Assim, saberíamos, se, de fato, há efeito dos parasitos na seleção sexual de indivíduos de populações naturais de aves.

Os efeitos de parasitos em indivíduos de populações naturais de aves em uma área de Cerrado brasileiro podem ser relevantes, tanto no que diz respeito à seleção sexual, quanto à manutenção individual. Aves parasitadas tem penas com menores concentrações de carotenoides e menores saturações quando comparados a indivíduos não parasitados. Isso acontece já que há um *trade-off* entre resposta imune e deposição de carotenoides em plumagens. Sendo que aqueles indivíduos parasitados, direcionam carotenoides para responder contra parasitos ao invés de depositar carotenoides em tegumentos. Esses resultados são importantes, uma vez que estudos demonstraram que fêmeas conseguem discriminar diferenças na saturação e preferem machos com maiores concentrações de carotenoides, sugerindo o quão importantes parasitos são para a seleção sexual em populações

naturais de aves. Além disso, foi feita uma relação entre dois índices previamente adotados como sendo referência para o status de saúde dos indivíduos, que são os índices de condição corporal e a coloração de plumagem por carotenoides. A relação negativa entre os dois mostra mais uma vez um *trade-off* em manter a condição corporal e investir em coloração por carotenoides. Sendo que aqueles que investem em coloração, não tem altos índices de condição corporal. As relações de *trade-off* entre condição corporal/resposta imune e coloração por carotenoides sugerem o quanto parasitos podem influenciar população no ambiente natural. Futuros estudos poderiam avaliar a discriminação de coloração e preferência de fêmeas, analisando os efeitos de parasitos na seleção sexual de aves.

Aguilera, E.; Amat, J. A. Carotenoids, immune response and the expression of sexual ornaments in male greenfinches (*Carduelis chloris*). *Naturwissenschaften*, v. 94, p. 895-902, 2007.

<https://doi.org/10.1007/s00114-007-0268-5>

Albon, S. D.; Stien, A.; Irvine, R. J.; Langvatn, R.; Ropstad, E.; Halvorsen, O. The role of parasites in the dynamics of a reindeer population. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v. 269, p. 1625-1632, 2002.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2064>

Alonso-Alvarez, C.; Bertrand, S.; Devevey, G.; Gaillard, M.; Prost, J.; Faivre, B.; Sorci, G. An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *The American Naturalist*, v. 164, p. 651-659, 2004.

<https://doi.org/10.1086/424971>

Andersson, S.; Prager, M. Quantifying colors. In: HILL, G. E.; MCGRAW, K. J. Cambridge: Harvard University Press, 2006, p. 41-89.

<https://issn.org/9780674018938>

Ardia, D. R. Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune function in Tree Swallows. *Journal of Animal Ecology*, v. 74, p. 517-524, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2005.00950.x>

ASKANAS, H. Does mating system affect the physiological stress of provisioning birds? A comparative study of polygynandrous bicknell's thrush (*Catharus bicknelli*) and socially monogamous swainson's thrush (*Catharus ustulatus*) breeding sympatrically. 2008, p. 118. Dissertação de mestrado em ciências (Biologia) - The University of New Brunswick, Canada, 2008.

Bächtold, A.; Del-Claro, K.; Kamisnki, L. A.; Freitas, A. v. L.; Oliveira, P. S. Natural history of an ant-plant butterfly interaction in a neotropical savanna. *Journal of Natural History*, v. 46, p. 15-16, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2011.651649>

Bensch, S.; Hellgren, O.; Pérez-Tris, J. MalAvi: a public database of malária parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 1353-1358, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x>

Cuthill, I. C. Color perception. In: Hill, G. E.; MCGRAW, K. J. *Bird Coloration, Methods and Mechanisms*, Volume 1. Cambridge, MA: Harvard University Press. 2006. p. 3-40.

De-Blas, E. G.; Mateo, R.; Alonso-Alvarez, C. Specific carotenoid pigments in the diet and a bit of oxidative stress in the recipe for producing red carotenoid-based signals. *Peer JS*, v. 4, p. 1-48, 2016.

<https://doi.org/10.7717/peerj.2237>

Del Cerro, S.; Merino, S.; Martínez-De La Puente, J.; Lobato, E. RUIZ-DE- CASTEÑEDA, R.; RIVERO-DE AGUILAR, J.; MARTÍNEZ, J.; MORALES, J.; TOMÁS, G.; MORENO, J. Carotenoid-based plumage colouration is associated with blood parasite richness and stress protein levels in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Oecologia*, v. 162, p. 825- 835, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s00442-009-1510-y>

Endle, J. A.; MIELKE- JR, P. W. Comparing entire colour patterns as birds see them. Biological Journal of the Linnean Society, v. 86, p. 405-431, 2005.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00540.x>

Fallon, S. M.; Ricklefs, R. E.; Swanson, B.L.; Bermingham, E. Detecting avian malaria: An Improved Polymerase Chain Reaction Diagnostic. Journal of Parasitology, v. 89, p. 1044-1047, 2003.  
<https://doi.org/10.1645/GE-3157>

Fenoglio, S.; Cucco, M.; Malacarne, G. The effect of a carotenoid-rich diet on immune competence and behavioral performances in Moorhen chicks. Journal of Evolutionary Biology, v. 14, 149-156, 2002.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2002.9522753>

FIGUEROLA, J.; MUÑOZ, R. G.; FERRER, D. Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the Cirl Bunting, *Emberiza cirlus*. Ecology, v. 13, p. 594-601, 1999.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00354.x>

Goodwin, T. W. The Biochemistry of Carotenoids. Volume 1. New York: Chapman & Hall, 1984.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-009-5542-4>

Gordon, D.; Abajian, C.; Green, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Research, v. 8, p. 195-202, 1998.  
<https://doi.org/10.1101/gr.8.3.195>

Green, A. J. Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? Ecology, v. 85, p. 1473-1483, 2001.  
[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[1473:MLRMOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[1473:MLRMOB]2.0.CO;2)

GREEN, P. Phrap. Available: <http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/phrap.htm>. 1994. Acessado em 2016, 10 de dezembro.

Hamilton, W. D.; Zuk, M. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science, v. 218, p. 384-387, 1982.  
<https://doi.org/10.1126/science.7123238>

Hellgren, O.; Waldenström, J.; Bensch, S. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. Journal of Parasitology, v. 90, p. 797-802, 2004.  
<https://doi.org/10.1645/GE-184R1>

Hill, G. E.; Hood, W. R.; Huggins, K. A multifactorial test of the effects of carotenoid access, food intake and parasite load on the production of ornamental feathers and bill coloration in american goldfinches. The Journal of Experimental Biology, v. 212, p. 1225-1233, 2009.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.026963>

Hill, G. E.; Inouye, C. Y.; Montgomerie, R. Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. Proceeding of the Royal Society B, v. 269, p. 1119 -1124, 2002.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1980>

Hörak, P.; Ots, I.; Vellau, H.; Spottiswoode, C.; Møller, A. P. Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia*, v. 126, p. 166-173, 2001.

<https://doi.org/10.1007/s004420000513>

Hudson, P. J.; Dobson, A. P.; Newborn, D. Prevention of population cycles by parasite removal. *Science*, v. 282, p. 2256 - 2258, 1998.

<https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2256>

Johnson, J. D.; Hill, G. E. Is carotenoid ornamentation linked to the inner mitochondria membrane potential? A hypothesis for the maintenance of signal honesty. *Biochimie*, v. 95, n. 2, p. 436-444, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.021>

Labocha, M. K.; Hayes, J. P. Morphometric indices of body condition in birds: a review. *Journal of Ornithology*, v. 153, p. 1-22, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s10336-011-0706-1>

Lachish, S.; Knowles, S. C. L.; Alves, R.; Wood, M. J.; Sheldon, B. Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population: the importance of ecological structure. *Journal of Animal Ecology*, v. 80, n. 6, p. 1-11, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01836.x>

Lozano, G. A. Carotenoids, parasites, and sexual selection. *Oikos*, v. 70, n. 2, p. 309-311, 1994.

<https://doi.org/10.2307/3545643>

Macdougall, A. K.; Montgomerie, R. Assortative mating by carotenoid-based plumage colour: a quality indicator in American goldfinches, *Carduelis tristis*. *Naturwissenschaften*, v. 90, n. 10, p. 464 – 467, 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00114-003-0459-7>

Marzal, A.; Bensch, S.; Reviriego, M.; Balbontin, J.; De Lope, F. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 21, p. 979-987, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01545.x>

McCallum, H.; Jones, M. E.; Hawkins, C.; Hamede, R. K.; Lachish, S.; Sinn, D. L.; Beeton, N.; Lazenby, B. Transmission dynamics of Tasmanian devil facial tumor disease may lead to disease-induced extinction. *Ecology*, v. 90, p. 3379-3392, 2009.

<https://doi.org/10.1890/08-1763.1>

McGraw, K. J. Mechanics of melanin coloration. In: *Bird Coloration: Measurements and Mechanisms*. Volume 1. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2006.

McGraw, K. J.; Ardia, D. R. Carotenoids, immune competence, and the information content of sexual colors: An experimental test. *American Naturalist*, v. 162, p. 704-712, 2003.

<https://doi.org/10.1086/378904>

Metzger, B. J.; Bairlein, F. Fat stores in a migratory bird: a reservoir of carotenoid pigments for times of need? *Journal of Comparative Physiology B*, v. 181, p. 269-275, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00360-010-0511-9>

Møller, A. P.; Biard, C.; Blount, J. D.; Houston, D. C.; Ninni, P.; Saino, N.; Surai, P. F. Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Avian and Poultry Biology Reviews*, v. 11, n.3, p.137-159, 2000.

Negro, J. J.; Figuerola, J.; Garrido, J.; Green, A. J. Fat stores in birds: na overlooked sink for carotenoid pigments? *Functional Ecology*, v. 15, p. 297-303, 2001.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2001.00526.x>

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation physiognomies and Woody flora of the Cerrado biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. *The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a Neo-tropical savanna* Columbia University Press, New York City, New York. 2002, p. 91-120.

<https://doi.org/10.7312/oliv12042-005>

Oliveira, P. S.; Marquis, R. J. *The Cerrados of Brazil. Ecology and natural history of a tropical savanna*. New York City, New York: Columbia University Press, 2002.  
<https://doi.org/10.7312/oliv12042>

Olson, V. A.; Owens, I. P. F. Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology and Evolution*, v. 13, p. 510-514, 1998.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01484-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01484-0)

Peig, J.; Green, A. J. New perspective for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, v. 118, p. 1883-1891, 2009.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>

Peig, J.; Green, A. J. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology*, v. 24, p.1323-1332, 2010.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01751.x>

Pike, T. W.; Blount, J. D.; Bjerkeng, B.; Lindström, J.; Metcalfe, N. B. Carotenoids, oxidative stress and female mating preference for longer lived males. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 274, p. 1591-1596, 2007.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0317>

Poulin, R.; Marshall, L. J.; Spencer, H. G. Genetic variation and prevalence of blood parasites do not correlate among bird species. *Journal of Zoology*, v. 252, p. 381-388, 2000.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb00633.x>

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.URL <http://www.R-project.org/>, 2015.

Ricklefs, R. E.; Outlaw, D. C. A molecular clock for malaria parasites. *Science*, v. 329, p. 226-229, 2010.  
<https://doi.org/10.1126/science.1188954>

Rocha, C.; Matias, R.; Aguiar, L. M.; Melo-Silva, C.; Gonçalves, B. B.; Mesquita-Neto, J. N. Caracterização da avifauna em áreas de Cerrado no Brasil Central. *Acta Biológica Catarinense*, v. 2, p. 49 -63, 2015.  
<https://doi.org/10.21726/abc.v2i2.202>

Saks, L.; McGraw, K.; Hörak, P. How feather colour reflects its carotenoid content. *Functional Ecology*, v. 17, p. 555-561, 2003.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00765.x>

Sambrook, J.; Russel, D. W.; Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York : CHSL Press, 2001.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA Polymerase/Nucleotide Sequences/Bacteriophage 4x174). *Proceeding of the national academy of science*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Sepp, T.; Karu, U.; Sild, E.; Männiste, M.; Hörak, P. Effects of carotenoids, immune activation and immune suppression on the intensity of chronic coccidiosis in greenfinches. *Experimental Parasitology*, v. 127, p. 651-657, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.12.004>

SIMONS, M. J. P.; COHEN, A. A.; VERHULST, S. What does carotenoid-dependent coloration tell? Plasma carotenoid level signals, immunocompetence and oxidative stress state in birds - A meta-analysis. *Plos One*, v. 7, 2012.

SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K.; WOOD, N. A. R.; BLOUNT, J. D.; BORTOLOTTI, G. R.; Sparks, N. H. C. Carotenoid discrimination by the avian embryo: A lesson from wild birds. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 4, p. 743-750, 2001.

Tomas, G.; Merino, S.; Moreno, J.; Morales, J.; MARTINEZ-DE LA PUENTE, J. Impact of blood parasites on immunoglobulin level and parental effort: a medication field experiment on a wild passerine. *Functional Ecology*, v. 21, p. 125-133, 2007.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01214.x>

TOOMEY, M. B.; MCGRAW, K. J. Mate choice for a male carotenoid-based ornament is linked to female dietary carotenoid intake and accumulation. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, n. 3, p. 1 -13, 2012.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-3>

Valkiunas, G. *Avian malarial parasites and other haemosporidia*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005. 932 pp.

Valkiunas, G.; Zickus, T.; Shapoval, A. P.; Lezhova, T. A. Effect of *Haemoproteus belopolskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the blackcap *Sylvia atricapilla*. *Journal of Parasitology*, v. 92, p. 1123-1125, 2006.  
<https://doi.org/10.1645/GE-3564-RN.1>

Von Schantz, T. V.; Bensch, S.; Grahn, M.; Hasselquist, D.; Wittzell, H. Good genes oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v. 266, p. 1-12, 1999.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0597>