
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

**Energética alimentar de *Gracilinanus microtarsus*
(Didelphimorphia: Didelphidae)**

DENIS CRISTIANO BRIANI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Zoologia).

Novembro - 2006

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

Energética alimentar de *Gracilinanus microtarsus*
(Didelphimorphia: Didelphidae)

DENIS CRISTIANO BRIANI

ORIENTADOR: PROF. DR. ARIOVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Zoologia).

Novembro - 2006

AGRADECIMENTOS

Essa tese é fruto do profissionalismo e competência da orientação do **Prof. Ariovaldo P. Cruz Neto**, que depositou confiança em todos nós. Obrigado pela oportunidade durante esses quatro anos o qual pude aprender muito com você.

Agradeço ao **Clube Náutico Araraquara** pelo apoio dado, cedendo suas áreas de Reserva Natural, assim como, toda a infraestrutura desde alojamento até alimentação.

Agradeço ao **Prof. Dr. Augusto Shinya Abe** pelo espaço cedido no jacarezário, pelas conversas e aprendizado. E também ao amigo e técnico do Depto. de Zoologia **Luiz Fernando Bonatti**, pelo apoio inicial no campo. Agradeço ao **Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis**, pela sugestão inicial do trabalho com *Gracilinanus microtarsus*.

Sem dúvida essa tese não sairia sem a parceria e o auxílio da **Luiza Duarte**. Ao nosso estagiário **Paul François “Franco-Paraguaio/Baiano”** pelo auxílio no campo, assim como pela nossa amizade.

Agradeço ao amigo **Prof. Dr. Henrique Caviedes**, pela amizade e pelo estágio concedido em seu laboratório da Universidade Nacional de San Luis – Argentina. Aos seus alunos e meus companheiros de laboratório **Juan, Maria Eugênia, Fabrício e Verônica** pelos ensinamentos, apoio e paciência em entender meu Portunhol.

Aos demais companheiros e amigos da Pós-graduação da Zoologia e aos Professores meu muito obrigado por esses quatro anos. Aos meus familiares pelo apoio e incentivo durante toda minha vida acadêmica.

Um agradecimento especial a **Angela** minha esposa, pelo incentivo, apoio e confiança nesses 12 anos de convivência.

Agradeço ao apoio financeiro do **CNPq** pela bolsa concedida. A **FUNDUNESP** por financiar parte das análises e por fim a **FAPESP** (proc. 00/09968-8) pelo suporte financeiro ao projeto. E como não poderia deixar de ser, agradeço aos equipamentos da **TOBEC** e principalmente da **SABLE** por nos proporcionar longos dias de coleta e análise de dados.

“estou quase convencido... de que as espécies (*isso é como confessar um assassinato*) não são imutáveis. Deus me livre do disparate lamarckiano... mas as conclusões a que sou levado não diferem muito das dele – embora os meios da mudança sejam inteiramente diferentes”

Charles Darwin: Carta a Hooker, 11/02/1844.



*Em memória ao amigo de pós-graduação
Daniel Ricardo Scheibler*

INDÍCE

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
Referências Bibliográficas.....	9
CAPÍTULO 1 – ESTIMATING LEAN AND LIPID MASS IN A MARSUPIAL: ASSESSING THE METHOD OF TOTAL BODY ELECTRICAL CONDUCTIVITY (TOBEC®).....	
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1. Introduction.....	16
2. Material and Methods.....	19
2.1 Measuring body electrical conductivity.....	20
2.2 Chemical Analysis.....	21
2.3 Generating Predictive Equations.....	22
2.4 Assessing and comparing the equations.....	23
3. Results.....	24
3.1 Chemically-determined Body Condition: General Patterns....	24
3.2 Lean Mass Estimates.....	24
3.3 Lipid Mass Estimates.....	25
4. Discussion.....	26
5. Acknowledgments.....	30
6. Literature Cited.....	32
CAPÍTULO 2 – FATORES QUE AFETAM A DINÂMICA DA CONDIÇÃO CORPÓREA DE <i>GRACILINANUS MICROTARSUS</i> (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE).....	
Resumo.....	44
Abstract.....	45

1. Introdução.....	46
2. Material e Métodos.....	49
2.1 Categorização da área de Estudo.....	49
2.2. Captura dos Animais e Determinação da Condição Reprodutiva.....	50
2.3 Condição Corpórea.....	51
2.4 Disponibilidade de Recursos: Coletas de Invertebrados e Frutas.....	52
2.5 Manuseio e Análise dos Dados.....	53
3. Resultados.....	55
3.1 Sazonalidade Climática e Disponibilidade de Recursos.....	55
3.2 Padrões Reprodutivos.....	56
3.3 Variabilidade na Massa Corpórea, Massa Magra e Massa de Lipídeos.....	57
4. Discussão.....	59
5. Agradecimentos.....	62
6. Literatura Citada.....	63

CAPÍTULO 3 - VARIABILIDADE DA TAXA METABÓLICA EM <i>GRACILINANUS MICROTARSUS</i> (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE): EFEITO DA DIETA E DA CONDIÇÃO CORPÓREA.....	75
--	----

Resumo.....	76
Abstract.....	77
1. Introdução.....	78
2. Material e Métodos.....	81
2.1 Obtenção de dados de taxa metabólica.....	81
2.2 Determinação da condição corpórea.....	83
2.3 Análise Isotópica de Nitrogênio e Carbono da dieta.....	83
2.4 Manuseio e Análise dos Dados.....	86
2.4.1 Descrição da Dieta.....	86
2.4.2 Padrões Metabólicos.....	86

3. Resultados.....	88
3.1 Análise da Composição Isotópica do Sangue e fatores que influenciam na Dieta.....	88
3.2 Variabilidade da Taxa Metabólica.....	89
4. Discussão.....	90
4.1 Dieta.....	90
4.2 Variabilidade da Taxa de Metabólica.....	91
5. Agradecimentos.....	94
6. Literatura Citada.....	95
 CONCLUSÃO GERAL.....	 107

RESUMO

O presente estudo versa sobre energética alimentar de um animal. O estudo procurou analisar, dentre outras coisas, os fatores intrínsecos e extrínsecos que respondem pela variabilidade na taxa metabólica em repouso (TMR) e a relação entre esta variação e padrões de história de vida de um marsupial (*Gracilinanus microtarsus*). Especificamente, a variabilidade da TMR seria determinada através de um aspecto específico da história de vida, a dieta. Aspectos como possíveis efeitos da dinâmica de variação das reservas energéticas sobre esta relação também foram analisados. Utilizando metodologia apropriada também analisamos a variação da disponibilidade e qualidade da dieta. Variações desses fatores induzem modificações na condição corpórea e, desta forma, os efeitos desta variável sobre a TMR mediarão um dos objetivos do estudo, servindo como elemento de ligação para averiguar quais componentes da condição corpórea seriam responsáveis pela variabilidade na TMR.

Palavras-Chave: energética, dieta, condição corpórea, taxa metabólica em repouso, *Gracilinanus microtarsus*, marsupial.

ABSTRACT

The present study turns about energetics to feed of an animal. The study analyzed, among other things, the intrinsic and extrinsic factors that answer for the variability in the resting metabolic rate (RMR) and the relationship between this variation and patterns of life history of a marsupial (*Gracilinanus microtarsus*). Specifically, the variability of RMR would be determined through an aspect specify of the life history, the diet. Aspects as possible effects of the dynamics of variation of the energy budge about this relationship were also analyzed. Using appropriate methodology also analyzed the variation of the availability and quality of the diet. Variations of those factors induce modifications in the body condition and, this way, the effects of this variable on RMR would mediate one of the objectives of the study, serving as connection element to discover which components of the body condition would be responsible for the variability in RMR.

Key words: energetic, diet, condition, resting metabolic rate, *Gracilinanus microtarsus*, marsupial.

INTRODUÇÃO GERAL

Padrões de história de vida são considerados como um conjunto de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que, de forma direta ou indireta, influenciam a sobrevivência e o sucesso reprodutivo e, em última análise, determinam a aptidão darwiniana das espécies (RICKLEFS, 1991; ROFF, 2002). Análises comparativas dos padrões de história de vida em endotérmicos (aves e mamíferos) revelam que as estratégias apresentadas situam-se dentro de um contínuo ao longo de um único eixo (“slow-fast continuum” – STEARNS, 1992; ROFF, 2002). Um dos aspectos mais marcantes que emerge destas análises é a noção de uma quase ausência de estratégias intermediárias entre os dois extremos do contínuo (RICKLEFS AND WIKELSKI, 2002). Esta observação sugere a existência de empecilhos evolutivos para a diversificação das estratégias de história de vida, sendo que fatores fisiológicos como metabolismo, nutrição e relações térmicas podem desempenhar um importante papel neste contexto (RICKLEFS AND WIKELSKI, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que fatores fisiológicos, notadamente aqueles associados aos padrões energéticos, são evolutivamente correlacionados com a estratégia de história de vida (PARTRIDGE AND HARVEY, 1988; PROMISLOW AND HARVEY, 1991; RICKLEFS, 1991; RICKLEFS AND WIKELSKI, 2002; CRUZ-NETO AND JONES, 2003). A importância de considerações energéticas pode ainda ser verificada pela observação de que grande parte da teoria ecológica está voltada para a

compreensão e explicação das interações entre a energética e estratégias de história de vida (McNAB, 2002). Por exemplo, estudos conduzidos por LOVEGROVE (2000, 2001, 2003) têm demonstrado que, para mamíferos em geral, há a existência de um contínuo metabólico que se correlaciona evolutivamente, em aspectos gerais, ao contínuo observado para as estratégias de história de vida. Em consequência, estes estudos demonstram que a verificação dos processos que culminaram na evolução da variabilidade de estratégias metabólicas é um pré-requisito para compreender a evolução da diversidade de estratégias de história de vida (LOVEGROVE, 2003).

Dentre as várias medidas dos padrões energéticos de animais endotérmicos, a taxa metabólica basal (TMB) é a medida mais bem documentada (e.g. BLAXTER, 1989; TIELEMAN AND WILLIAMS, 2000; McNAB, 2002; WHITE AND SEYMOUR, 2003; WITHERS, *et al.*, 2006). Operacionalmente, a TMB é definida como sendo a quantidade mínima de energia necessária para manter a homeostase em animais normotérmicos na ausência de atividade externa, em animais adultos, não-reprodutivos, inativos e dentro da zona da neutralidade térmica (KLEIBER, 1961; McNAB, 1992, 1997, 2002). Apesar de existirem algumas controvérsias acerca da abrangência desta definição (e.g. CRUZ-NETO, *et al.*, 2003, CRUZ-NETO AND BOZINOVIC, 2004), a TMB vem sendo utilizada para predizer ou ser correlacionada com diversos processos biológicos intimamente relacionados com os padrões de história de vida (e.g. KOZLOWSKI AND WEINER, 1997; McNAB, 2002; LOVEGROVE, 2003).

Uma das críticas que se faz aos critérios para se definir TMB, é que raramente tais condições se dêem simultaneamente (CRUZ-NETO, *et al.* 2003). Alguns animais são praticamente impossíveis de se medir em repouso ou em condições pós-absortivas (e.g. SPEAKMAN, 2000; McNAB, 2002). Para algumas pequenas aves e morcegos, o estado pós-absortivo pode implicar em uma redução da temperatura corpórea tendo como consequência mudanças na TMB (e.g. MORRIS, *et al.*, 1994; LOPEZ-CALLEJA AND FERNÁNDEZ, 2003). Em outro extremo os grandes ruminantes produzem calor como produto da fermentação digestiva, o qual tem influência direta na TMB (McNAB, 2002).

Desta forma, esses animais se encontram em condições de metabolismo mínimo, por definição não se ajustam aos requisitos da TMB. Nestas situações sugere-se adotar o protocolo proposto por THOMPSON (1992), o qual utiliza o termo taxa metabólica em repouso (TMR), para medidas feitas sobre condições que violem um ou mais dos critérios usados para se definir TMB (SPEAKMAN *et al.*, 2003, 2004). Em nosso estudo utilizamos o termo TMR, pois incluímos em nossas análises animais reprodutivos, violando assim umas das premissas acima.

O presente estudo versa sobre energética alimentar de um animal, mais especificamente sobre o significado funcional e as bases estruturais do metabolismo em uma espécie de marsupial. O estudo procurou analisar, dentre outras coisas, os fatores extrínsecos e intrínsecos que respondem pela variabilidade na taxa metabólica em repouso (TMR), e a relação entre esta variabilidade e padrões de história de vida (ver CRUZ-NETO *et al.*, 2003; CRUZ-NETO AND JONES, 2004).

Dentro deste objetivo amplo, e com base no contexto apresentado acima, o projeto em tela teve como objetivo central determinar o significado funcional da TMR. Especificamente, o significado funcional seria determinado cotejando a variabilidade na TMR com um aspecto específico da história de vida, a dieta. Como será explorada abaixo, a dieta pode influenciar de forma direta ou indireta o metabolismo (CRUZ-NETO AND BOZINOVIC, 2004). Tal influência depende da maneira como os animais lidam com as flutuações na qualidade e disponibilidade de alimento, e potencialmente, estaria correlacionada com os demais aspectos da história de vida, como por exemplo, condição corpórea. A decisão de se trabalhar com uma espécie de marsupial é basicamente em função de evidências que sugerem um certo conservantismo nas estratégias de história de vida de marsupiais que podem ter relação com a suposta redução no metabolismo basal destas espécies quando comparada a mamíferos eutérios (McNAB, 2002, 2005; WITHERS *et al.*, 2006). Os dados apresentados formam um quadro abrangente da variabilidade da TMR, das bases estruturais desta variabilidade, e sua relação com a dieta.

No tocante a variabilidade da taxa metabólica, especialmente em mamíferos, é explicada principalmente por diferenças na massa e temperatura corpórea que podem responder por cerca de 90% desta variação (McNAB, 2002, 2005; WITHE AND SEYMOUR, 2003; MUÑOZ-GARCIA AND WILLIAMS, 2005). Por outro lado, quando os efeitos desses fatores, são controlados, ainda observa-se uma variação residual (LOVEGROVE, 2000; TILEMAN AND WILLIAMS, 2000; WHITE AND SEYMOUR, 2003, WITHERS *et al.*, 2006). Essa variação residual vem sendo discutida basicamente por dois grupos de hipóteses. A primeira atribui a variabilidade residual a fatores filogenéticos (e.g. HAYSEN AND LACY, 1985; ELGAR AND HARVEY, 1987; BENNETT AND HARVEY, 1987; WITHERS *et al.*, 2006), ao passo que a segunda a associa a fatores ecológicos, principalmente a dieta e fatores climáticos, independentes da filogenia (McNAB, 2002, 2005; LOVEGROVE, 2003).

Quanto ao hábito alimentar animais que apresentam uma dieta facilmente digerida, livre de agentes químicos e/ou que estariam disponíveis ao longo do ano estão associadas a altas TMB (McNAB, 1986, 1992, 2002). Esta associação pressupõe evolução correlativa entre dieta e TMB. Todavia, a nível próximo (ecológico), existem algumas maneiras de um organismo lidar com uma queda na qualidade de seu recurso (e.g. CRUZ-NETO AND BOZINOVIC, 2004).

Em marsupiais, por exemplo, a variação na TMB está relacionada principalmente a variações na massa corpórea, tendo o hábito alimentar como um os fatores responsáveis pela variação residual (McNAB, 1980a, 1980b, 1983, 1986a, 2002, 2005). Por sua vez, a dieta pode ser dividida em dois grupos quanto a sua influência na TMB: aqueles que tendem a uma alta TMB e aqueles com tendência a uma baixa TMB (McNAB, 1986a). Marsupiais com dieta especializada em invertebrados, frutos ou folhas apresentam uma baixa TMB, por outro lado, espécies com uma dieta a base de vertebrados ou plantas herbáceas apresentam maior TMB (McNAB, 1978; McNAB, 1986b; BOZINOVIC, *et al.* 2005).

Nenhum dos estudos mencionados acima que procuraram verificar a relação entre dieta e padrões metabólicos quantificaram os possíveis efeitos da

dinâmica de variação das reservas energéticas sobre esta relação. Portanto a possibilidade de que ao menos uma parte da diferença observada nestes estudos tenham sido ocasionados por diferenças na dinâmica de utilização das reservas energéticas ainda é uma questão em aberto. Pelo exposto, mudanças na qualidade e disponibilidade da dieta poderiam induzir modificações na condição corpórea e, desta forma, a análise dos efeitos desta variável sobre a TMR mediará um dos objetivos do projeto, servindo como elemento de ligação para averiguar as bases estruturais responsáveis pela variabilidade na TMR.

A massa corpórea de um animal não é constante ao longo do tempo, apresentando variações diárias e sazonais (e.g. SPEAKMAN, 1996). Portanto, não causa surpresa a constatação de que a relação alométrica entre TMB e massa corpórea em um contexto intraespecífico seja pouco visível, o que sugere que a variabilidade na TMB não pode ser simplesmente explicada como sendo uma consequência da variação na massa total de um organismo (KOZLOWSKI AND WEINER, 1997). Como a principal causa da variação na massa corpórea entre indivíduos adultos e não-reprodutivos de uma mesma espécie está associada à dinâmica da composição corpórea (taxas de deposição e utilização das reservas energéticas - e.g. POND, 1978), estudos sobre a relação entre estas variações e os padrões metabólicos poderiam ser úteis para se analisar as bases estruturais responsáveis pela variabilidade na TMR (e.g. EARLE AND LAVIGNE, 1990; SCOTT *et al.*, 1996; BURNESSE *et al.*, 1998).

Neste contexto o Capítulo 2 nos deu subsídios para que pudéssemos verificar possíveis alterações na condição corpórea em função de fatores como época do ano, período reprodutivo, disponibilidade de recursos. Posteriormente testando os efeitos da variabilidade da condição corpórea sobre o padrão metabólico de *G. microtarus* (Capítulo 3).

O capítulo 1 versa sobre a validação do método utilizado para estimar a condição corpórea, conhecido como método para análise de condutividade elétrica corpórea “TOBEC”. Apesar de ser considerado um método não-invasivo, TOBEC requer validação contra dados químicos, e esta validação é espécie-específica. Procuramos validar o método para estimar dois

compartimentos da condição corpórea, massa magra e massa de lipídeos, para *G. microtarsus*. Procuramos também testar a precisão e acuracidade dos diversos modelos de regressão propostos para a validação do método. Após a validação do método, descrevemos no capítulo 2 a dinâmica anual da condição corpórea através de seus dois compartimentos (massa magra e massa de lipídeos). Possíveis efeitos de fatores como sexo, condição reprodutiva, época do ano e disponibilidade de recursos (biomassa de frutas e invertebrados), foram testadas através do Modelo Linear Geral.

Pelo exposto no neste capítulo, modificações em função de sazonalidade ambiental da dieta poderiam induzir modificações na condição corpórea, e desta forma, o objetivo do Capítulo 3 mediará a análise dos efeitos desta variável sobre a TMR. Neste capítulo pretendeu-se verificar a variabilidade da TMR em função de variações na condição corpórea e na dieta de *G. microtarsus*. A associação da massa corpórea e dieta com TMR podem revelar as causas envolvidas na magnitude e variabilidade da TMR, desta forma, uma análise sobre o significado funcional da condição corpórea requer identificar os prováveis efeitos destas variações sobre o orçamento energético da espécie sob condições naturais (McNAB, 1997; SPEAKMAN, 2000).

Literatura Citada

- BENNETT, A. F. AND RUBEN, J. A. 1979. Endothermy and activity in vertebrates. *Science*, 206:649-654.
- BLAXTER, H. 1989. *Energy Metabolism in Animals and Man*. Cambridge University Press, Cambridge.
- BOZINOVIC, F., RUIZ, G., CORTEZ, A. AND ROSENMANN, M. 2005. Energetic, thermoregulation and torpor in the Chilean mouse-opossum *Thylamys elegans* (Didelphidae). *Revista Chilena de Historia Natural*. 78.
- BURNES, G.P., YDENBERG, R.C. AND HOCHACHKA. 1998. Interindividual variability in body composition and resting oxygen consumption in breeding tree-swallows, *Tachycineta bicolor*. *Physiol. Zool.* 71: 247-256.
- CRUZ-NETO, A.P. AND BOZINOVIC, F. 2004. The relationship between diet quality and basal metabolic rate in endotherms: insights from intraespecific analysis. *Physiological and biochemical zoology*. 77(6): 877:889.
- CRUZ-NETO, A. P., D. C. BRIANI AND F. BOZINOVIC. 2003. La tasa metabólica basal: ¿una variable unificadora en energética animal? En: *Fisiología Ecológica & Evolutiva: Teoría y Casos de Estudio*. (F. BOZINOVIC, EDITOR). Editora da Universidad Católica de Chile.
- CRUZ-NETO, A. P. AND JONES, K. 2003. The evolution of basal metabolic rate in bats In: ZUBAID, A. MCCracken, G.F. & KUNZ, T.H. (eds). *Functional and evolutionary ecology of bats*. Oxford University Press.
- EARLE, M. AND LAVIGNE, D.M. 1990. Intraspecific variation in body size, metabolic rate and reproduction of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Can. J. Zool.* 68: 381-388.
- ELGAR, M.A., AND HARVEY, P. H. 1987. Basal metabolic rates in mammals: allometry, phylogeny and ecology. *Functional Ecology*, 1: 25-36.

- HAYSEN, V., AND LACY, R. C. 1995. Basal metabolic rate in mammals: taxonomic differences in the allometry of BMR and body mass. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81A: 741-754.
- KLEIBER, M. 1961. *The fire of life: An Introduction to animal energetics*. Wiley & Sons. New York.
- KOZLOWSKI, J. AND WEINER, J. 1997. Interspecific allometries are by-products of body size optimization. *The American Naturalist*. 149:352-380.
- LÓPEZ-CALLEJA, M. V. AND FERNÁNDEZ, M. J. 2003. El tiempo y la regulación del presupuesto de energía: el caso de los picaflones. En: *Fisiología Ecológica & Evolutiva: Teoría y Casos de Estudio*. (F. BOZINOVIC, EDITOR). Editora da Universidad Católica de Chile.
- LOVEGROVE, B. G. 2000. The zoogeography of mammalian basal metabolic rate. *The American Naturalist*. 156: 201-219.
- LOVEGROVE, B. G. 2001. The evolution of body armor in mammals: Plantigrade constraints of large body size. *American Naturalist*, 55: 1464-1473.
- LOVEGROVE, B. G. 2003. The influence of climate on the basal metabolic rate of small mammals: a slow-fast metabolic continuum. *J. comp Physiol B*. 173:87-112.
- MCNAB, B. K. 1978. The comparative energetics of Neotropical marsupials. *Journal of Comparative Physiology*. 125: 115-128.
- MCNAB, B. K. 1980. Food habits, energetics, and the population biology of mammals. *The American Naturalist*. (A). 116:106-124.
- MCNAB, B. K. 1980. On estimating thermal conductance in endotherms. *Physiol. Zool.* (B). 53:145-156.
- MCNAB, B. K. 1983. Energetic, body size, and the limits to endothermy. *J. Zool. Lond.*, 199:1-19.
- MCNAB, B. K. 1986. Food habits, energetics, and the reproduction of marsupials. *J. Zool. Lond* (A) 208: 595-614.

- McNAB, B. K. 1986. On estimating thermal conductance in endothermy. *J. Zool. Lond., (B)*. 199: 1-19.
- McNAB, B. K. 1992. Energy expenditure: a short history. Pp 1-15 in T. E. Tomasi & T.H. Horton (eds), *Mammalian Energetics: Interdisciplinary Views of Metabolism and Reproduction*, Cornell University Press, Cornell.
- McNAB, B. K. 1997. On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiol. Zool.* 70: 718-720.
- McNAB, B. K. 2002. *The Physiological ecology of vertebrates: A view from energetics*. Cornell University Press, Ithaca.
- McNab, B. K. 2005. Uniformity in the basal metabolic rate of marsupials: its causes and consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*. 78: 183-198.
- MORRIS, S., CURTIN, A. L. AND THOMPSON, M. B. 1994. Heterothermy, torpor, respiratory gas exchange, water balance and the effect of feeding in Gould's long-eared bat *Nyctophilus gouldi*. *Journal of Experimental Biology*. 197:309-335.
- MUÑOZ-GARCIA A. AND WILLIAMS, J. B. 2005. Basal Metabolic rate in Carnivores is associated with diet after controlling for phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*. 78(6):1039-1056.
- PARTRIDGE, L AND HARVEY, P. H. 1988. The ecological context of life history evolution. *Science*. 241: 1449-1455.
- PROMISLOW, D. E. L. AND HARVEY, P. H. 1991. Mortality rates and the evolution of mammal life histories. *Acta Oecologia*. 12: 119-137
- RICKLEFS, R. E. 1991. Structures and transformations of life histories. *Func. Ecol.* 5: 174-183.
- RICKLEFS, R. E. AND WIKELSKI, M. 2002. The physiology/life history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*. 17: 462-468.
- ROFF, D. A. 2002. *Life history evolution*, Sinauer Associates.

- SCOTT, I, SELMAN, C., MITCHELL, P. I. AND EVANS, P. R. 2001. The use of total body electrical conductivity (TOBEC) to determine body composition in vertebrates. In: SPEAKMAN, J.R. ed.). *Body Composition Analysis of Animals. A Handbook of non-Destructive Methods*. 242 p.
- SPEAKMAN, J. R. 1996. Energetics and the evolution of body size in small terrestrial mammals. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 69: 63-81.
- SPEAKMAN, J. R. 2000. The cost of living: field metabolic rates of small mammals. *Adv. Ecol. Res.* v. 30: 178-297.
- SPEAKMAN, J. R., ERGON, T., CAVANAGH, K., REID, K., SCANTLEBURY, D. M. AND LAMBIN, X. 2003. Resting and daily energy expenditures of free-living field voles are positively correlated but reflect extrinsic rather than intrinsic effects. *Proc Natl Acad Sci.* 100:14057-14062.
- SPEAKMAN, J. R., KRÓL, E. AND JOHNSON, M. S. 2004. The functional significance of individual variation in basal metabolic rate. *Physiol Biochem Zool.* 77:900-915.
- STEARNS, S. C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press.
- THOMPSON, S. D. 1992. Gestation and Lactation in small mammals: Basal Metabolic Rate and the Limits of Energy Use. In: T. E. TOMASI, T. H. HORTON (eds) *Mammalian Energetics*, Ithaca, N.Y., Cornell University Press.
- TIELEMAN B. I. AND WILLIAMS J. B. 2000. The adjustments of avian metabolic rates and water fluxes to desert environments. *Physiological and Biochemical Zoology.* 73:461-479.
- WHITE, C. R. AND SEYMOUR, R. S. 2003. Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass^{2/3}. *Proc. Natl Acad Sci.* 100:4046-4049.
- WITHERS, P. C., COOPER, C. E. AND LARCOMBE, A. N. 2006. Environmental Correlates of Physiological Variables in Marsupials. *Physiological and Biochemical Zoology.* 79: 437–453.

CAPÍTULO 1

**ESTIMATING LEAN AND LIPID MASS IN A MARSUPIAL: ASSESSING THE
METHOD OF TOTAL BODY ELECTRICAL CONDUCTIVITY (TOBEC®).**

Resumo

A condição corpórea de um animal esta associada ao seu estado energético e, portanto, fornecem uma medida indireta da aptidão. Métodos químicos para quantificar a composição corpórea são mais precisos, mas tem o inconveniente de serem destrutivos. Como forma de contornar estes problemas diversas metodologias indiretas foram desenvolvidas, sendo o uso da condutividade elétrica corpórea total (TOBEC) uma das mais utilizadas. Apesar de ser considerado um método não-invasivo, TOBEC requer validação contra dados químicos, e esta validação é espécie-específica. No presente trabalho, procuramos validar o método TOBEC para estimar dois compartimentos da condição corpórea, massa magra e lipídeos, para o marsupial *Gracilinanus microtarsus*. Procuramos também testar a precisão e acuracidade dos diversos modelos de regressão propostos para a validação do método. Apesar do método TOBEC ter sido adequado para estimar a massa magra de *G. microtarsus*, sua eficiência é maior quando utilizado em conjunto com outras medidas biométricas para corrigir eventuais diferenças interindividuais na massa corpórea ou na massa magra. Portanto, não encontramos justificativa para o uso do chamado modelo clássico para estimar a massa magra com o método TOBEC. Não encontramos diferença entre os chamados modelos de dois estágios ou modelos diretos e inversos para estimar a massa de lipídeos. Todavia, a capacidade do método, independentemente do modelo utilizado, mostrou-se aquém da desejada para estimar a quantidade de lipídeos. Portanto, a baixa capacidade do método não reflete qual o tipo de modelo utilizado, mas sim as condições intrínsecas de reserva de gordura do que ao método propriamente dito.

Palavras-Chave : EM-SCAN TOBEC®, condição corpórea, massa magra, massa de lipídeos, marsupial, *Gracilinanus microtarsus*

Abstract

Body condition refers to some attributes of an animal that reflects its well-being and which, directly or indirectly, ultimately contribute to its fitness. The most accurate and precise way to estimate body condition is by chemical analysis, but this method has several drawbacks. To minimize such drawbacks, several indirect models have been proposed, and indirect estimates of body condition by quantification of the body electrical conductivity has witnessed a growing usage. In the present work, we empirically validate the TOBEC® method to estimate the body condition of the marsupial *Gracilinanus microtarsus*. The second aim of our study was to test assumptions regarding the best way to formulate predictive models to estimate body condition from TOBEC® measurements. The TOBEC® method was precise and accurate enough to estimate lean mass for *G. microtarsus*, and its efficiency was improved when used in conjunction with other morphometric measurements. In this case, E-index seems to be more suitable to correct for eventual interindividual differences in Mb or in LMb rather than a predictive factor on its own. Thus, we did not find justification to the “classical” approach used to estimate lean mass with this method. We did not find any difference between the two-stage and the direct models to estimate lipid mass. It seems that the low ability of the TOBEC® method in estimate lipid mass did not reflected the type of the model used but, rather, the inefficiency of the method when applied to animals that do not accumulate proportionally higher amount of fat.

Key words: EM-SCAN TOBEC®, body condition, lean mass, fat mass, marsupial, *Gracilinanus microtarsus*

1. Introduction

Body condition refers to some attributes of an animal that reflects its well-being and which, directly or indirectly, ultimately contribute to its fitness. Often, body condition is associated with an organism's energetic state, so that estimates of lipid mass is assumed to provide an accurate measurement of body condition (POND, 1978; WOLLNOUGH, *et al.* 1997; SCHULTE-HOSTEEDDE *et al.* 2001; 2005). Analysis of the dynamics of the variation in body condition has provided powerful insights for elucidating several aspects of the ecology and physiology of different vertebrate species (e.g. BACHMAN, 1994; KARASOV AND PINSHOW, 1998; BACHMAN AND WIDEMO, 1999; SCHULTE-HOSTEDDE *et al.* 2001; PANGLE AND SUTTON 2005; PIERCE *et al.*, 2005). Even though the energy densities of hydrated lean body tissue is nearly 10 times lower than the energy of fat tissue (BINTZ, 1985), the energy conveyed by the lean tissue can also, under some circumstances, be an important source of energy (ROBBINS, 1993; BACHMAN, 1994). Thus, an accurate estimate of body condition requires the estimate of both lean and lipid mass. In this context, the definition of body condition overlaps with that of body composition, in the sense that both pertain to the variation of the body protein, carbohydrates, lipids and water of an organism (ROBBINS, 1993; WOLLNOUGH *et al.*, 1997).

The most accurate and precise way to estimate body condition is by chemical analysis of the homogenized carcass (REYNOLDS AND KUNZ, 2001).

Besides the inherent problems associated with adequate sample size and/or ethical considerations, this purely invasive method does not allow for temporal resolution. An indirect estimate of body condition, thus, offers an alternative approach for chemical analysis. The use of morphometric indexes is thought to be a convenient way to overcome these problems. Albeit such approach allows for longitudinal measurements, its precision and accuracy seems to depend upon the underlay statistical methods used to generate the models. Besides, this approach rests on the often-untested assumption that the variability in the morphometric indexes parallels the variability in body condition (e.g. HAYES AND SHONKWILLER, 2001; GREEN, 2001; SCHULTE-HOSTEDDE *et al.* 2001; 2005).

Indirect estimates of body condition by quantification of the body electrical conductivity has witnessed a growing use in the past decades. This method relies on the fact that the conductivity of a living organism is mainly determined by its lean mass, which contains most of the electrolytes, and that the conductivity of the lipid mass is only 5% of that observed for lean mass (VAN LOAN AND MAYCLIN, 1987; SCOTT, *et al.* 2001). Hence, if one assumes a two-compartmental model, the lipid mass can be simply estimated by the difference between total fresh body mass and the lean mass estimated by the electrical conductivity (SCOTT *et al.*, 2001). Two main methods have been used to assess body condition through electrical conductivity: body impedance analysis (BIA – LICHTENBELT, 2001) and the method of total body electrical conductivity (TOBEC® – SCOTT *et al.*, 2001). The use of BIA with small mammals and birds is still incipient (LICHTENBELT, 2001; KARASOV AND PINSHOW, 1998; WIRSING *et al.*, 2002; WOOLNOUGH *et al.*, 1997). On the other hand, TOBEC® has been widely used to estimate body condition in small mammals and birds (SCOTT *et al.*, 2001 and references therein; UNANGST AND WUNDER, 2002; WIRSING *et al.* 2002) and, compared with BIA, it has produced results fairly similar in terms of precision and accuracy (KARASOV AND PINSHOW, 1998; WIRSING *et al.* 2002).

The utility of TOBEC® depends, among other factors, on the tridimensional distribution of the lean mass within the body (SCOTT *et al.* 2001).

This means that the validation of the method for a given species does not have applicability for other species, even when they have the same geometry (SKAGEN *et al.*, 1993; UNANGST AND WUNDER, 2001). Thus, the first objective of this study is to empirically validate the use of TOBEC[®] method to estimate body condition in *Gracilinanus microtarsus*, a marsupial species from South America. WOLLNOUGH *et al.* (1997) used BIA to estimate body water in the Australian marsupial *Lasiorninus latifrons*, which was validated against the isotopic dilution method to estimate lipid mass PARKER AND KROCKENBERGER (2002) used TOBEC[®] and the isotopic dilution method to validate the use of total body water to estimate lipid mass in another Australian marsupial (*Isodon macrourus*). Hence, our study is the first to be carried out to estimate body condition in a New-World marsupial and also the first where the TOBEC[®] method was directly used to estimate lean and lipid mass in a marsupial.

The second aim of our study was to test assumptions regarding the best way to formulate predictive models to estimate body condition from TOBEC[®] measurements. The most widely used approach to validate the TOBEC[®] method involves the use of ordinary least square equations (OLS) to relate the chemically-determined lean mass with the variation in the electrical conductivity and, latter, the validation of the resultant equation in an independent sample or through cross-validation methods (SCOTT *et al.*, 2001 and references therein). However, considerable debate still exists as to which variable should be used as the independent ones in such predictive equations (SCOTT *et al.*, 2001). Besides this controversy, the use of direct or inverse equations and the two-stage model to estimate lipid mass has produced conflicting results (SKAGEN *et al.* 1993; CONWAY *et al.*, 1994; BURGER, 1997; SCOTT *et al.*, 2001; VOLTURA AND WUNDER 1998; UNANGST AND WUNDER, 2001; 2002). Few studies that attempted to validate the TOBEC[®] method compared the accuracy and precision of the predictive equations as function of the assumption about the variables and the impact of this assumptions on the resultant estimate of lipid mass (SKAGEN *et al.*, 1993; BURGER, 1997). Notwithstanding the species-specific nature of the validation of the TOBEC[®] method (UNANGST

AND WUNDER, 2001), we believe that such comparisons are worth in that they may provide useful recommendations for another validation studies. Furthermore, we believe that such comparisons may help in the search for the mostly accurate and precise equations to predict body condition within a temporal scale. Thus, in order to test for the accuracy and precision of the models, we carried out paired comparisons between the absolute and relative errors associated with the direct, inverse models to estimate lean mass and direct, inverse and two-stage model to estimate lipid mass with the TOBEC® method.

2. Material and Methods

Adult, non-reproductive females ($n = 7$) and males ($n = 10$) of *G. microtarsus* were collected with Sherman traps between February and July 2004 in a savana-like vegetation (locally know as Cerradão) in the municipality of Américo Brasiliense, São Paulo State, southeastern Brazil ($21^{\circ}43'33''\text{S}$ and $48^{\circ}01'07''\text{W}$). In order to avoid the potential effects of capture (stress, changes in body water, etc), and of the stomach content on the conductivity readings (VOLTURA AND WUNDER, 1998; SCOTT *et al.*, 2001), animals were kept in individual cages for one day before the measurements, when they were feed with artificial diets (Purina, < 5% crude fiber), and had *ad libitum* access to water. Cages were kept at room temperature (between 25 – 28°C). Experiments were carried out at the same period of the day (between 16:00-18:00 hours) out in animals food-deprived for 12 hours, within temperature similar to those used for maintenance.

This work was carried out under permission issued by the “Instituto Brasileiro de Meio Ambiente”, Brazil (IBAMA (64/2003-CGF AU/LIC – proc. 02001.007176/03-69) and all procedures conformed to guidelines of the American Society of Mammalogists (Animal Care and Use Committee 1998).

2.1 Measuring body electrical conductivity

All measurements of body electrical conductivity were carried out in an EM-SCAN® Small Animal Body Composition Analyser model SA-3057. Initially we attempted to use the smallest detection chamber (model SA-3044). However, we found that the background levels of this chamber consistently remained outside the factory-specified levels, even after warm-up times in excess of 3 hours. Thus, we decided to use the largest chamber available, which attained stability after a warm-up time of less than an hour. In principle, the most precise readings are obtained in chamber with the smallest possible internal diameter. However, VOLTURA AND WUNDER (1998) found that the predictive error associated with a detection chamber (model SA-3044) was higher than the predictive error associated with the use of a larger detection chamber (model SA-2) for prairie voles (*Microtus ochrogaster*). Thus, we assumed that the use a larger detection chamber in our study did not affect the accuracy of our readings.

We warmed-up the instrument for at least 3 hours before the onset of conductivity measurements (hereafter referred to as E-index, the output of the EM-SCAN®). After, we placed each individual into the holding acrylic device supplied by the factory, and constancy of position was assured by restraining the unanesthetized animal with nylon mesh stock secured to the holding device by Velcro fastenings. The holding device were then fully inserted into the detection chamber, with the closed part facing up, and with the belly snugly pressed against the wall of the chamber. The holding device were inserted and positioned in the center of the detection chamber until a stable reading was obtained (usually less than 10 seconds). Then, the holding device was removed and re-inserted, a new reading was taken, and the protocol repeated 5 times. This procedure was repeated for all measurements in all individuals and took less than 5 minutes. The E-index obtained in such runs were then averaged and used for subsequent analysis. Mean coefficient of variation (CV) calculated from the mean and standard deviations of these individuals successive readings gave a value of $0.57 \pm 0.11\%$ (0 – 1.86%). Prior to the measurements, the equipment were calibrated by inserting a phantom tube with a know

electromagnetic field (E-index = 400). The reference phantom was inserted 3 times. Average readings were equal to 404.7 ± 1.91 (range: 395.3 – 414.8; CV = 1.94%), well within the confidence limits determined by the manufacturer. Body mass were measured also prior and after the readings with an electronic balance (precision of $\pm 0.01\text{g}$) and a mean value were used for latter calculations. Although body temperature was not measured, we did not observed any sign of torpor after the end of the experiments. Finally, chemically determination of body water content (see Table 1) revealed that all animals were in a good hydration state.

2.2 Chemical Analysis

Immediately after the last reading, animals were killed by a ketamine overdose and carcass was frozen in liquid N_2 until they were homogenized in the laboratory (usually 3-5 days latter). Homogenization was accomplished by grinding the carcass in an industrial blender several times. During the homogenization procedure, no organs were removed and we found that all the stomachs were emptied. The resultant frozen homogenate was sent by contract to the Animal Nutrition Laboratory of The Federal University of Ponta Grossa (Paraná State) where they were dried in an oven at 50°C until constant weight. Fat content was extracted by the Soxhelt method, following standard procedures (see details in REYNOLDS AND KUNZ, 2001), usually in triplicates. We used a two-compartment model to chemically assess the body composition (REYNOLDS AND KUNZ, 2001). Water content was determined as the difference between fresh dead mass and the dry mass. Fat mass was equal to the extracted fat, and lean mass is the difference between dead fresh body mass and fat mass, and thus, includes the water content of the animal. Accordingly to the contracted laboratory standards the coefficient of variations (CV) associated with fat determination were always less than 3%.

2.3 Generating Predictive Equations

Before generating predictive equations from regression analysis, we tested for normality, with a Kolmogorov-Smirnov test, all variables involved in the analysis. K-S distances for all variables showed no detectable departure from normality ($P > 0.05$ for all variables). In the course of derivation of all the regression models described below, we also checked for potential outliers by calculating Cook's distances from the residuals and flagging those that exceeded or approached 1 (ZAR, 1999). In no circumstances we found an outlier in our data set. Finally, t-tests showed that there were no differences between males and females in any of the body compartments (see Table 1 for results), or in the E-index value ($t = 0.15$; $df = 15$; $P = 0.9$). Thus, gender was not considered for generating the models.

Values of fresh total body mass (Mb), E-index, wet lean body mass (LMb) and wet lipid mass (LiMb) were used in simple and multiple regressions to derive equations to predict body condition of *G. microtarsus*. We opted to use only ordinary least regressions (OLS) because preliminary analysis showed that other equations (polynomials, quadratic) did not improve the predictive power. In the inverse models, LMb and LiMb were used in an OLS as the independent variables, whereas E-index and Mb were used as the dependent variables. Thus, LMb and LiMb were obtained by algebraic transformations, and the confidence and predictive intervals calculated by the inverse procedure (ZAR, 1999). We did not present multiple inverse equations due to the impossibility of calculating confidence and predictive intervals for such estimates (ZAR, 1999 – see discussion). We also generated equations from direct models to estimate LMb and LiMb. In this case, we used multiple (E-index and Mb jointly as independent variables) and simple regressions (E-index and Mb analysed separately). Confidence and prediction intervals for such equations were calculated following ZAR (1999). Further, we also used the two-stage model, whereby LiMb is estimated by the difference between Mb and LMb obtained from the inverse and direct models, as described above. It should be noted that, with this approach, absolute errors, but not the relative errors (see below), were the same as those calculated from the estimates of LMb (SCOTT *et al.*, 2001).

2.4 Assessing and comparing the equations

We evaluated the predictive power of each equation (for lean mass and fat mass) by using the procedure described by SCOTT *et al.* (2001). We first calculated the absolute error of each equation by a method known as cross-validation (e.g. SKEGEN *et al.*, 1993; UNANGST AND MERKELY, 2002). In this method, a value for a given animal was omitted and a regression equation is generated and used to predict the value for this particular animal. The difference between the actual and the predicted value is termed the individual absolute error. Then, this point is added back and a new point removed until all individuals were accounted. The average of all individual absolute errors is termed the average absolute error. The sum of square of the individual errors gives the Predicted Error Sum of Squares (PRESS), which is a useful measure of how well the regression equation fits the data (ZAR, 1999). Finally, we used the protocol suggested by SCOTT *et al.* (2001) to calculate the relative error of predictive equations. The mean absolute error is compared against the variation range of the chemically determined values used in the calibration equations. If the absolute errors, within a 95% confidence interval, exceeded these values, then the resolution of the equation cannot be considered fine enough to predict the value of interest. Accordingly to SCOTT *et al.* (2001), errors expressed in the context of the variability in the limits of the estimated value are more indicative of the accuracy of a given equation than the errors estimated by conventional method. Direct, pairwise, comparisons between the absolute and relative errors, PRESS statistics and the prediction and confidence intervals were jointly used to choose the best equations among the several ones generated to predicted lean and lipid mass of *G. microtarsus*. We carried out all analysis with the software Statistica 7.0, used a fiducial level of 0.05% to access significance. Unless otherwise noted, mean values were presented with their respective standard errors.

3 Results

3.1 Chemically-determined Body Condition: General Patterns

Biometric and chemically-determined parameters of body condition of *G. microtarsus* are presented in Table 1. These values were latter used to validate the TOBEC[®] method. Overall, the variables showed lower coefficient of variation (CV). An exception was the amount of lipid mass, which showed CV up to 50%. Hydration state was considered satisfactory, with total body water content ranging from 60 to 70% of Mb. A correlation analysis among all the components (absolute values) of body condition listed in Table 1 showed significant pairwise correlations ($P < 0.05$ for all cases) but for between LiMb and E-Index ($P = 0.08$), and between LiMb and body water content ($P = 0.07$).

3.2 Lean Mass Estimates

Results obtained for LMb estimates of *G. microtarsus* with the direct and inverse models are presented in Table 2. In the linear equation 1 (direct model), using only Mb as the independent variable, 99% of the variability in LMb is predicted by the variability in Mb, with a mean absolute error of 0.23g. Thus, the relative error of the estimate is only 4% of the actual variation in LMb (8.4g-see Table 1). The direct model using only E-Index as the predictor variable (equation 2 – Table 2), explain 85% of the variation in LMb, with a mean absolute error of 0.90g, which translate into a relative error of 14%. The confidence and prediction intervals to estimate a mean value of LMb with this model are wider than the limits observed with the use of equation 1 (Table 3). When E-Index and Mb were jointly used to predict LMb (multiple regression-equation 3), the mean absolute error was similar to those observed for the equation 1, the relative error decreased by 0.2%, the PRESS statistics showed a lower value (Table 2), and the confidence and prediction intervals narrowed (Table 3). Taken together, these results suggest a better accuracy of the direct multiple regression to estimate LMb.

Equations derived from OLS with the inverse model did not improve the accuracy and precision of the LMb estimates. When Mb was used as the dependent variable, the absolute and relative error was similar to the analogous

direct equation (equation 1), but the confidence interval increased substantially (Table 3). By using E-index as the dependent variable increases the mean absolute error to 1.10g, which translate into a relative error of 16.4%. When compared to the analogous direct model (equation 2), both confidence and prediction intervals showed wider amplitudes (Table 3).

3.3 Lipid Mass Estimates

Estimates of LiMb were carried out with two procedures: via two-stage model and with a similar procedure used to estimate LMb (direct and inverse models). Table 4 shows the results obtained for estimates of LiMb from direct and inverse models. As hitherto reported, no correlation was found between LiMb and E-index, so results from direct and inverse models using only these two variables were not presented. In the resultant linear direct model, variation in Mb explained 40% of the variation in LiMb. The relative error indicates that 30% of the total variation in the estimated LiMb can be attributed to the error of the model. When a multiple regression model was used, including E-index along with Mb as the predictor variables, the accuracy and precision of the estimate improved. In fact, adding E-index to the model further increased in 11% the amount of the explained variability in LiMb. Furthermore, the value for the PRESS statistics lowered and the relative error of the estimate decreased by 1% (Table 4). Finally, for direct models confidence and prediction intervals for the multiple regressions narrowed when compared with the linear equation to estimate LiMb (Table 5). For the inverse model, linear equation using Mb as the dependent variable, the mean absolute error in the estimate of LiMb was 0.4g (Table 4).. Compared with the actual range of LiMb (1.3g – Table 1), this absolute error translates into a relative error of 49.3% (Table 4). In terms of confidence intervals, the inverse model gave intervals whose range were 40% higher than those observed for the analogous direct model (Table 5).

Comparisons of the accuracy and precision of the LiMb estimates with the use of the two-stage procedure (subtracting LMb from Mb) were carried out by the analysis of the relative error of the estimates (Figure 1). Thus, within the amplitude of the chemically-determined LiMb, the best model indicated that

29% of the variability in the estimate can be due to the error associated with the multiple regression model used to estimate L_{Mb}. Furthermore, the magnitude of this error did not differ irrespective of whether L_{Mb} was calculated from L_{Mb} estimated either by direct (linear or multiple regressions) or inverse models. On the other extreme, L_{Mb} calculated from L_{Mb} estimates using solely E-index (either direct or inverse models) gave relative errors that exceeded 100% (Figure 1).

4 Discussion

Like most of other validation studies (SCOTT *et al.*, 2001 and references therein; WIRSING *et al.*, 2002), our results attest that the TOBEC[®] method is accurate and precise enough to estimate L_{Mb} of *G. microtarsus*. However, our analysis suggests that the “classical” approach used to generate predictive equations does not offer the best results. In the “classical” approach used to estimate L_{Mb} with the TOBEC[®] method, simple OLS regressions were generated with E-index as the response variable and L_{Mb} as the independent variable. With this procedure, estimate of L_{Mb} is done algebraically by manipulating the resultant linear regression (inverse models – WALSBURG, 1988; CASTRO *et al.*, 1990; VOLTURA AND WUNDER, 1998; UNANGST AND WUNDER, 2001; 2002). The “classical” approach can be justified because the variability in L_{Mb} is responsible for the variability in the E-index (SCOTT *et al.*, 2001), and because OLS models assume that the independent variable is measured without error (ZAR, 1999). Although it is impossible to call into question the direction of the dependence between L_{Mb} and E-index, it is not so clear why measurements of E-index should have larger errors than the chemically estimation of L_{Mb}. If certain conditions are observed, specially the constancy of position inside the detection chamber, E-index can be obtained with fairly small errors (CONWAY *et al.*, 1994; KARASOV AND PINSHOW, 1998; SCOTT *et al.*, 2001; WIRSING *et al.*, 2002). Moreover, quantification of body condition by chemical methods is only accurate when extreme care is observed in all the steps involved in this procedure (REYNOLDS AND KUNZ,

2001). Thus, at least based on the assumption of measurement errors, there is no reason *a priori* to adopt the “classical” approach. In our analysis, for instance, estimate of LMb directly from E-index (or Mb - i.e. the direct model) had the same precision and accuracy as those observed for the correspondent inverse model (Tables 2 and 4 – see also SKAGEN *et al.*, 1993; CONWAY *et al.*, 1994; BURGER, 1997).

Notwithstanding this fact, and irrespective of whether direct or inverse models are used, OLS models generated using only E-index had lower resolution than the same models generated using only Mb. Besides the higher absolute and relative errors, the lower resolution of models using only E-index can be assessed by comparing the confidence and prediction intervals with those obtained from models using only Mb. Using only direct models as an example, the 95% prediction interval for the equation using only Mb shows that a prediction of LMb for a new sample of *G. microtarsus* would lie within 0.14 and 0.32 grams of the measured value (Table 3). This interval covers only 1.7 to 3.8% of the observed range of LMb in the sample (8.4 grams – Table 1). Prediction of LMb from this equation for a single case would lie within 0.58 e 0.63 grams of the observed value, an interval covering 6.8% to 7.5% of the observed value. On the other hand, when only E-index was used, prediction of LMb for a new sample would represent, with 95% of probability, 52 to 56%, respectively, of the observed limit of LMb. As noted by BURGER (1997), these results would not have changed had the limits been compared using inverse models. When E-index and Mb were used as independent variables, prediction of LMb for a new sample would lie within 0.13 and 0.24 grams of the measured value, with 95% probability. This interval covers 1.5 to 2.8% of the actual range of LMb in our sample. This is a rather small improvement in the predictive power of the equation when compared with results from other studies, where other morphometric measurements were used along with Mb and E-index (CONWAY *et al.*, 1994; BURGER, 1997). Nevertheless, our results suggest that the predictive power of the equation used to predict LMb tends to increase when multiple regressions are used. Thus, this results support our suggestion that there is no reason *a priori* to use the “classical” approach to estimate LMb.

Furthermore, as pointed out by SKAGEN *et al.* (1993), it seems that the (small) improvement of the multiple regression in prediction LMB when E-Index is included as an independent occurs only because this variable corrects individual differences in LMB and Mb rather than because of its underlying predictive power.

Even though TOBEC® method was not developed to estimate lipid mass, the widespread notion that body condition is tightly related to energy stores in the form of fat depots (POND, 1978; SCHULTE-HOSTEEDE *et al.*, 2001; 2005) probably was the main driven force behind the studies that attempted to use this technique to estimate LiMb (SCOTT *et al.*, 2001 and references therein). The first approach toward this goal was the so-called two-stage model, where a two-compartmental model for body condition was assumed and LiMb was estimated by the difference between Mb and TOBEC® estimated value (from inverse models) of LMB (WALSBERG, 1988; CASTRO *et al.*, 1990; ROBY, 1991). In our study, estimating LiMb using this approach gave a relative error higher than 100%. Probably, this high error is due to two reasons: first, it reflects the higher error observed from estimates of LMB from E-Index in the inverse model and, second, the fact that LiMB is only a small portion of Mb (MORTON, 1991). Using LMB estimated from direct models did not minimize the higher error associated with the two-stage model. However, the error was substantially reduced (ca. 30%) when LiMB was estimated from Mb (either with direct and inverse models) or from multiple regression using both Mb and E-index. Thus, we found no justification to the use of the method whereby estimate of LMB from linear regression with E-index and subsequent estimate of LiMb by subtraction from Mb is used to quantify body condition using TOBEC® (WALSBERG, 1988; CASTRO *et al.*, 1990; ROBY, 1991).

One of the drawbacks of the two-stage model to estimate LiMb from the difference between Mb and multiple-regression estimates of LMB is that it is impossible to place confidence and prediction intervals when inverse model is used. Such limits are important in that they allow the analysis of the extent by which the accuracy of body condition estimates in a given sample could be used to predict body condition for a new single case or sample (ROBY, 1991;

SKAGEN *et al.*, 1993; CONWAY *et al.*, 1994). Thus, some authors suggested that LiMb should be estimated directly from E-Index, and that the inclusion of morphometric measurements improve the predictive power of these equations (MORTON, 1991; SKAGEN *et al.*, 1993; VOLTURA AND WUNDER, 1998; UNANGST AND WUNDER, 2001; 2002). We found that the direct estimation of LiMb from E-index and Mb using a multiple regression would lie, within a 95% limit, within 0.15 and 0.32 grams of the measured value, an interval covering 14.4 to 31% of the observed limit of LiMb, and that the prediction of LiMb for a single new case would lie around 1.07 grams of the observed value, a value more than 10% higher than the observed limit of LiMb. It is worth mention that these calculations were based on our best model to directly estimate LiMb; for the other models (see Table 5), the confidence and intervals limits increased substantially. Also, the relative error for this model did not differ from our best model derived from the two-stage approach (ca. 30%).

Taken together, our results show that, despite the possibility of placing confidence and prediction intervals from direct estimates of LiMb, the best two-stage model to estimate LiMb gave exactly the same error as the direct estimate of LiMb (using LiMb as a response variable). Such a similarity was already noted in previous studies (BURGER, 1997; VOLTURA AND WUNDER 1998; SCOTT *et al.*, 2001). More important, however, is that, irrespective of the model used, TOBEC® method is not efficient to estimate LiMb for *G. microtarsus*. The high error of the estimate and the wide prediction interval suggests a reduced ability of this method to predict LiMb for a single new case and, to a lesser extent, of a new sample. Albeit our best equation to estimate LiMb only included a single morphometric variable (Mb), we do not believe that inclusion of additional biometric measurements would have increased the predictive power of this equation. As noted by other authors, TOBEC® is relatively inefficient to predict LiMb for animals that had lower fat mass (in relation to Mb) and/or that shows lower variability in the amount of fat mass (SKAGEN *et al.*, 1993; BURGER, 1997; VOLTURA AND WUNDER, 1998; UNANGST AND WUNDER, 2001; 2002). This seems to be the case for *G. microtarsus*: the amount of lipid mass is less than 5% of Mb and, although

interindividual variability was higher than 50%, the range of LiMb did not exceeded 1 gram. Furthermore, likely other marsupials (McNAB, 1986), most of the fat depots of *G. microtarsus* might be restricted to a single place in the body (e.g. tail), and this uneven distribution might introduce bias in the conductivity measurement using TOBEC® (UNASGST AND MERKELY, 2002).

In summary, the TOBEC® method was precise and accurate enough to estimate LMb for *G. microtarsus*, and its efficiency was improved when used in conjunction with other morphometric measurements, such as Mb. In this case, E-index seems to be more suitable to correct for eventual interindividual differences in Mb or in LMb rather than a predictive factor on its own. Thus, we did not find justification to the “classical” approach used to estimate LMb with this method. Judging only from comparison of the relative errors, we did not find any difference between the two-stage and the direct models to estimate LiMb. It seems that low ability of the TOBEC® method in estimate LiMb did not reflected the type of the model used but, rather, the inefficiency of the method when applied to animals that do not accumulate proportionally higher amount of fat. This lower efficiency was also observed when other methods (BIA, isotopic dilution) where used in animals with intrinsically lower amount of fat and/or when fat content showed a lowered individual variability (PARKER AND KROCKENBERGER, 2002; WIRSING *et al.*, 2002). We are aware that this results should prevent us to give a take-home advice concerning the accuracy of the TOBEC® method to estimate LiMb. Nevertheless, the similarity in the results obtained from the two-stage and the direct estimates of LiMb (using LiMb as dependent variable), lead us to agree with the advice made by BURGER (1997), that the two-stage models should be favored because it preserved the real relationship that exists among the body condition compartments.

5 Acknowledgments

This study was financially supported by a grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) awarded to Ariovaldo P. Cruz-Neto (proc. 00/09968-8) and Denis C. Briani was supported by a PhD fellowship

from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq – proc. 140245/2003-0). We acknowledge the director board of the Clube Náutico de Araraquara for the permission and logistic support during our fieldwork and to Paul F. Colas Rosa for helping us during different phases of this project.

6 Literature Cited

- ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE. 1998. Guidelines, handling, and cares of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *Journal of Mammalogy*, 79: 1416 – 1431.
- BACHMAN, G. C. 1994. Food restriction effects on the body composition of free-ranging ground squirrels, *Spermophilus beldingi*. *Physiological Zoology* 67:756-770.
- BACHMAN, G. C. AND F. WIDEMO. 1999. Relationships between body composition, body size and alternative reproductive tactics in a lekking sandpiper, the ruff (*Philomachus pugnax*). *Functional Ecology* 13:411-416.
- BINTZ, G. L. 1985. Radioglucose metabolism by Richardson's grounds squirrel in the weight-gain and weight-loss phases of circannual cycle. *Journal of Comparative Physiology* 156B:87-93
- BURGER, M. F. 1997. Estimating lipid and lean mass in a wintering passerine: an evaluation of TOBEC®. *The Auk* 114:762-769.
- CASTRO, G., B. A. WUNDER AND F. L. KNOPF. 1990. Total body electrical conductivity (TOBEC®) to estimate total body fat of free-living birds. *The Condor* 92:496-499.
- CONWAY, C. J., W. R. EDLEMAN AND K. L. SIMPSON. 1994. Evaluation of lipid indices of the wood thrush. *The Condor* 96:783-790.
- GREEN, A. J. 2001. Mass/Length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82:1473-1483.
- HAYES, J. P. AND J. S. SHONKWILLER. 2001. Morphometric indicators of body condition: worthwhile or wishful thinking? Pp. 8-38 in *Body composition analysis of animals: a handbook of non-destructive methods* (J. R. Speakman, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- KARASOV, W. H. AND B. PINSHOW. 1998. Changes in lean mass and in organs of nutrient assimilation in a long-distance passerine migrant at a springtime stopover site. *Physiological Zoology* 71:435-448.

- LICHTENBELT, W. D. V. M. 2001. The use of bioelectrical impedance analysis (BIA) to estimate body composition. Pp. 161-182 in Body composition analysis of animals: a handbook of non-destructive methods (J. R. Speakman, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- MCNAB, B. K. 1986. Food habits, energetics, and the reproduction of marsupials. *Journal of Zoology London* 208:595-614.
- MORTON, J. M., R. L. KIRKPATRICK, AND E. P. SMITH. 1991. Comments on estimating total body lipids from measures of lean mass. *The Condor* 93:463-465.
- PANGLE, K. L. AND T. M. SUTTON. 2005. Temporal changes in the relationship between condition indices and proximate composition of juvenile *Coregonus artedii*. *Journal of Fish Biology* 66:1060-1072.
- PARKER, A. K. AND A. K. KROCKENBERGER. 2002. Sometimes the simple way is bets: an evaluation of total body electrical conductivity (TOBEC®) and a morphological index as predictors of total body water in the northern brown bandicoot, *Isoodon macrourus*. *Wildlife Research* 29:135-140.
- PIERCE, B. J., S. R. MCWILLIAMS, T. P. O'CONNOR, A. R. PLACE AND C. G. GUGLIELMO. 2005. Effect of dietary fatty acid composition on depot fat and exercise performance in a migrant songbird, the red-eyed viro. *Journal of Experimental Biology* 208:1277-1285.
- POND, C. M. 1978. Morphological aspects and the ecological and mechanical consequences of fat deposition in wild vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 9:519-570.
- REYNOLDS, D. S AND T. H. KUNZ. 2001. Standard methods for destructive body composition. Pp. 39-55 in Body composition analysis of animals: a handbook of non-destructive methods (J. R. Speakman, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- ROBBINS, C. T. 1993. *Wildlife feeding and Nutrition*. Academic Press, New York.
- ROBY, D. D. 1991. A comparison of two noninvasive techniques to measure total body lipid in live birds. *The Auk* 108:509-518.

- SCHULTE-HOSTEDDE, A. I., J. S. MILLAR AND G. J. HICKLING. 2001. Evaluation of body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology* 79:1021-1-29.
- SCHULTE-HOSTEDDE, A. I., B. ZINNER, J. S. MILLAR AND G. J. HICKLING. 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86: 155-163.
- SCOTT, I., C. SELMAN, P. I. MITHCELL, AND P. E. EVANS 2001. The use of total body electrical conductivity (TOBEC®) to determinate body composition in vertebrates. Pp. 127-157 in *Body composition analysis of animals: a handbook of non-destructive methods*. (J. R. Speakman, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- SKAGEN, S. K., F. L. KNOPF AND B. S. CADE. 1993. Estimation of Lipids and Lean Mass of Migrating Sandpipers. *The Condor* 95: 944-956.
- UNANGST, E. T AND B. A. WUNDER. 2001. Need for species-specific models for body composition estimates of small mammals using EM-SCAN®. *Journal of Mammalogy* 82:527-534.
- UNANGST, E. T. AND L. A. MERKLEY. 2002. The effects of lipid location on non-invasive estimates of body composition using EM-SCAN® technology. *Journal of Experimental Biology* 205:3101-3105.
- UNANGST, E. T AND B. A. WUNDER. 2002. Effects of trap retention on body composition of live meadow voles. *Physiological and Biochemical Zoology* 75:627-634.
- VAN LOAN, M. AND P. MAYCLIN. 1987. A new TOBEC® instrument and procedure for the assessment of body composition: use of Fourier coefficients to predict lean body mass and total body water. *American Journal of Clinical Nutrition* 45:131-137.
- VOLTURA, M. B AND B. A. WUNDER. 1998. Electrical conductivity to predict body composition of mammals and the effect of gastrointestinal contents. *Journal of Mammalogy* 79:279-286.
- WALSBERG, G. E. 1988. Evaluation of a nondestructive method for determining fat stores in small birds and mammals. *Physiological Zoology* 61:53-159.

- WIRSING, A. J., T. D. STEURY AND D. L. MURRAY. 2002. Noinvasive estimation of body composition in small mammals: a comparison of conductive and morphometric techniques. *Physiological and Biochemical Zoology* 75:489-497.
- WOLLNOUGH, A.P., W.J. FOLEY, C.N. JOHNSON AND M. EVANS. 1997. Evaluation of techniques for indirect measurement of body composition in a free-ranging large herbivore, the south hairy-nosed wombat. *Wildlife Research* 24:649-660.
- ZAR, J. H. 1999. *Bioestatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.

Table 1 – Summary of biometric values and body condition parameters of *Gracilinanus microtarsus*. Values expressed as means $\pm$ 1 standard deviation. Number in parenthesis indicates amplitude of pooled data (males and females). CV = coefficient of variation (%). Data for % of lipid mass expressed as a function of total fresh body mass, and data for % of body water expressed as a function of lean mass. P refers to probability associated with comparisons (from a t-test) of mean values of males and females.

	Pooled (n = 17)	Males (n = 10)	Females (n = 7)	P
Body Mass (g)	17.8 $\pm$ 2.74 (13.5 – 22.7) (CV = 15.4)	17.9 $\pm$ 2.5 (CV = 13.9)	17.6 $\pm$ 3.2 (CV = 18.2)	0.83
Lean Mass (g)	17.1 $\pm$ 2.54 (13.2 – 21.6) (CV = 14.8)	17.2 $\pm$ 2.4 (CV = 13.9)	16.9 $\pm$ 2.9 (CV = 7.2)	0.81
Lipid Mass (g)	0.72 $\pm$ 0.34 (0.29 – 1.33) (CV = 47.2)	0.71 $\pm$ 0.32 (CV = 45.1)	0.73 $\pm$ 0.39 (CV = 53.4)	0.92
Body Water (g)	12.4 $\pm$ 2.12 (9.34 – 16.3) (CV = 17.1)	12.4 $\pm$ 2.2 (CV = 17.7)	12.2 $\pm$ 2.2 (CV = 18)	0.85
% Lipid Mass	3.94 $\pm$ 1.56 (1.87 – 6.27) (CV = 39.3)	3.96 $\pm$ 1.61 (CV = 40.7)	3.91 $\pm$ 1.62 (CV = 41.4)	0.95
% Body Water	72.1 $\pm$ 3.13 (64.5 – 76.8) (CV = 4.3)	71.9 $\pm$ 4.1 (CV = 5.7)	62.3 $\pm$ 1.1 (CV = 18)	0.80

Table 2 – Equations generated to estimate lean mass (LMb) of *Gracilinanus microtarsus* through direct and inverse models. LMb = Lean body mass (grams). Mb = Fresh body mass (grams). E-index = TOBEC® derived measurement of conductivity. SEE = Standard error of the equation (grams). PRESS = value for the PRESS statistics. MAE = Mean absolute error (grams). 95%CL = 95% confidence limit of the equations. RE = Relative Error. (calculated accordingly to Scott et al. (2001). See text for further details.

Equations	SEE	PRESS	MAE	RE (%)
Direct Model				
1) LMb = 0.67(±0.4) + 0.92(±0.02)Mb $r^2 = 0.99$; P < 0.001	0.27	1.33	0.23 ± 0.04 95%CL = 0,08	3.77
2) LMb = – 4.69(±2.37) + 0,17(±0.02)E-index $r^2 = 0,85$; P < 0.001	1,02	1.84	0.90 ± 0.04 95%CL = 0.31	14.4
3) LMb = –0.24(±0.66) + 0.02(±0.01) E-index + 0.83(±0.05)Mb $r^2 = 0.99$; P < 0.001	0.25	1.18	0.22 ± 0.03 95%CL = 0.07	3.57
Inverse Model				
4) Mb = –0.53(±0,49)+1.07(±0.03)LMb $r^2 = 0.99$; P < 0.001	0.28	1.38	0,23 ± 0,04 95%CL = 0.08	3.77
5) E-index = 41.6(±9.14)+4,88(±0.53)LMb $r^2 = 0.85$; P < 0.001	1.10	24.9	1.06 ± 0..15 95%CL = 0.31	16.4

Table 3 – Estimated values (grams) from the direct and inverse equations used to predict lean mass. Estimations are the 95% confidence (CI) and prediction intervals (PI) for the mean and maximum values of lean mass derived from each predictive equation. Symbols as in Table 2.

Equation	Mean (g) $\pm$ 95% CI (95% PI)	Maximum (g) $\pm$ 95% CI (95% PI)
Direct Model		
$L_{Mb} = 0.67 + 0.92 \cdot M_b$	17.1 ± 0.14 (0.58)	21.61 ± 0.32 (0.63)
$L_{Mb} = -4.69 + 0.17 \cdot E\text{-index}$	17.1 ± 4.38 (4.71)	22.05 ± 4.18 (4.71)
$L_{Mb} = -0.24 + 0.02 \cdot E\text{-index} + 0.83 \cdot M_b$	17.1 ± 0.13 (0.56)	21.74 ± 0.24 (0.61)
Inverse Model		
$M_b = -0.53 + 1.07 L_{Mb}$	17.1 ± 0.60 (1.2)	21.7 ± 0.70 (1.3)
$E\text{-index} = 41.6 + 4.88 L_{Mb}$	17.1 ± 4.5 (4.9)	22.96 ± 4.5 (4.8)

Table 4 – Equations generated to estimate lipid mass (LiMb) of *Gracilinanus microtarsus* through direct and inverse models. Symbols as in Table 2.

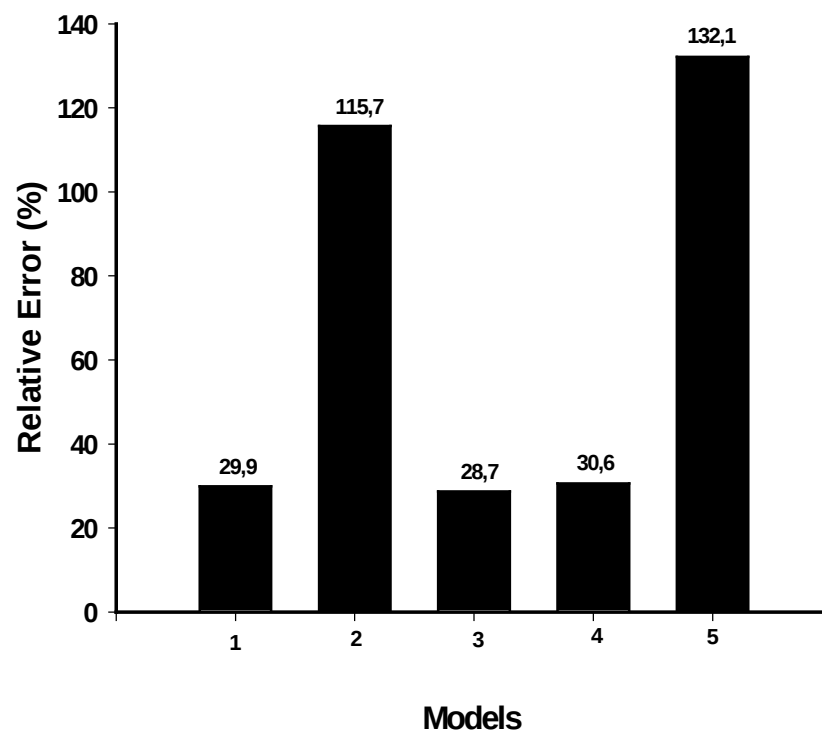
Equations	SEE	PRESS	MAE	RE (%)
Direct Model				
1) $\text{LiMb} = -0.66 (0.4) + 0.08(0.02)\text{Mb}$ $r^2 = 0.4; P=0.007$	0.27	1.33	0.23 ± 0.04 95%CL = 0.08	30.3
2) $\text{LiMb} = 0.25(0.66) - 0.02(0.01)\text{E-index}$ $+ 0.17(0.05) \text{Mb}$ $r^2 = 0.51; P=0.007$	0.25	1.18	0.23 ± 0.03 95%CL = 0.07	29.2
Inverse Model				
1) $\text{Mb} = 14.13(1.28) + 5.14(1.63)\text{LiMb}$ $r^2 = 0.4; P<0.001$	0.43	3.46	0.4 ± 0.06 95%CL = 0.11	49.1

Tabela 5 – Estimated values (grams) from the direct and inverse equations used to predict lipid mass. Estimations are the 95% confidence (CI) and prediction intervals (PI) for the mean and maximum values of lipid mass derived from each predictive equation. Symbols as in Table 2.

Equation	Mean (g) $\pm$ 95% CI (95% PI)	Máximo(g) $\pm$ 95% CI (95% PI)
Direct Model		
$\text{LiMb} = -0.66 + 0.08 \cdot \text{Mb}$	0.72 ± 0.91 (1.07)	1.09 ± 0.89 (1.06)
$\text{LiMb} = 0.25 - 0.02 \cdot \text{E-Index} + 0.17 \cdot \text{Mb}$	0.72 ± 0.15 (0.55)	0.97 ± 0.32 (0.63)
Inverse Model		
$\text{Mb} = 14.13 + 5.14 \cdot \text{LiMb}$	0.72 ± 1.25 (1.35)	1.46 ± 0.93 (1.35)

Legend

Figure 1 – Relative error in the estimation of lipid mass with two-stage model. Models numbers refers to OLS (linear or multiple) used to estimate lean mass from direct and inverse models. See Table 2 for the sequence of the models (equations).

Figure 1.

CAPÍTULO 2

Fatores que afetam a dinâmica da condição corpórea de *Gracilinanus microtarsus* (Didelphimorphia: Didelphidae).

Resumo

Neste estudo nós analisamos e descrevemos a dinâmica da condição corpórea de uma população de *Gracilinanus microtarsus* (WAGNER, 1842), baseados em dados coletados entre os meses de janeiro a dezembro de 2004. A diferença encontrada na condição corpórea entre sexo depende da condição reprodutiva. Entretanto os modelos mostraram que tais interações dependem da biomassa de invertebrados. Machos reprodutivos e não reprodutivos apresentam maiores valores absolutos de massa magra (MM) e de massa de lipídeos (ML) quando comparados às fêmeas. Quando comparados em termos relativos ambos os sexos não apresentaram diferenças significativas na (%MM) e na (%ML). Em resumo, a espécie apresenta um aumento da condição corpórea, ajustados à estação úmida e ao período reprodutivo. Desta forma parece claro que estratégias de história de vida e outras variáveis e interações entre fatores climáticos, alimentares, fisiológicos e também sociais determinam direta e indiretamente a dinâmica da condição corpórea de *G. microtarsus*.

Palavras-Chave : condição corpórea, massa magra, massa de lipídeos, marsupial, *Gracilinanus microtarsus*

Abstract

In this study we analyzed and we described the possible responsible factors for the variability of the corporal condition of a population of *Gracilinanus microtarsus* (Wagner, 1842), based on data collected among the months of January to December of 2004. The difference found in the body condition between males and females depends on the reproductive condition. However the model showed that such interplay depends on the biomass of invertebrate. Reproductive males and no reproductive they present larger absolute values of lean mass (MM) and of fat mass (ML) when compared the females. When compared in relative terms the sexes didn't present significant differences in the (%MM) and (%ML). In a brief way, the species present an increase of all the components of the body condition, adjusted to the humid season and the reproductive period. This way of course strategies of life history and another variables and interplay among factors climatic, diet, physiologic and social determine direct and indirectly the dynamics of the body condition of *G. microtarsus*.

Key words: body condition, lean mass, fat mass, marsupial, *Gracilinanus microtarsus*

1. Introdução

Padrões de história de vida são considerados como um conjunto de características morfológicas, fisiológicas e comportamentais as quais, de forma direta ou indireta, influenciam a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de um organismo (STEARNS, 1992; ROFF, 2002). Diversas destas características apresentam ciclos dinâmicos em ambientes sazonais que são considerados adaptações frente às flutuações climáticas e de disponibilidade de recursos (LINDSTEDT AND BOYCE, 1985; ROFF, 2002). A condição corpórea de um animal reflete seu estado energético e pode ser considerada um componente das estratégias de história de vida, uma vez que diversos parâmetros relacionados à reprodução e sobrevivência estão correlacionados com variações na condição corpórea (BACHMAN AND WIDEMO 1999; SCHULTE-HOSTEDDE *et al.*, 2001; 2005). Nesse contexto o entendimento da dinâmica da condição corpórea de uma espécie é de suma importância, pois sua variabilidade pode ser um indicador de respostas frente a tais variações sazonais (LIMA *et al.*, 1997).

Em mamíferos, a massa corpórea total é usualmente utilizada como indicador da condição de um indivíduo, e além das variações induzidas por fatores extrínsecos ligados a sazonalidade do ambiente (clima, qualidade e disponibilidade de recursos -; MERRIT *et al.*, 2001; PEACOCK *et al.*, 2004; LI AND WANG, 2005; LOVEGROVE, 2005) diversos estudos demonstraram que a massa corpórea também pode variar devido a fatores intrínsecos (e.g., sexo e condição reprodutiva - KWIECINSKI *et al.*, 1987; CAUGHTLEY AND SINCLAIR,

1994, HARDER *et al.*, 1996; REYNOLDS AND KUNZ, 2000; KROCKENBERGER, 2003). A premissa de que variações na massa corpórea refletem modificações na condição corpórea baseiam-se na suposição de que estas mudanças são usualmente associadas a reservas de gordura. Além de problemas de cunho estatístico (GREEN, 2001; SCHULTE-HOSTEDDE *et al.* 2001; 2005), esta premissa desconsidera o fato de que, embora a densidade energética do tecido adiposo ser até 10 vezes maior do que a energia contida no tecido corpóreo magro hidratado (proteínas e carboidratos - BINTZ 1985), esta última pode, em determinadas circunstâncias, ser uma importante fonte de reserva energética (BACHMAN, 1994; KARASOV AND PINSHOW, 1998; PIERCE AND McWILLIAMS, 2004) e, desta forma, também ser responsável pela variação na massa corpórea. Portanto, verificar a premissa de que variação na massa corpórea reflete mudanças na condição corpórea, e analisar a extensão pela qual estas variações estão associadas á ajustes adaptativos nas estratégias de história de vida requer a análise conjunta das fontes (fatores intrínsecos e extrínsecos) e dos padrões de variação na massa corpórea total, na quantidade de gordura e da massa magra (BACHMAN, 1994; BACHMAN AND WIDEMO, 1999).

A distinção entre iteroparidade (múltiplos eventos reprodutivos durante o ciclo de vida) e semelparidade (um único evento reprodutivo durante o ciclo de vida, após o qual os organismos morrem) é uma das mais fundamentais dicotomias nas estratégias de história de vida (STEARNS, 1992, ROFF, 2002). Em vertebrados terrestres, a semelparidade é restrita a machos de apenas algumas espécies de marsupiais das famílias Dasyuridae e Didelphidae (BRADLEY, 1997; BOONSTRA, 2005). Afora uma provável predisposição filogenética (OAKWOOD *et al.*, 2001), a sazonalidade do ambiente traduzida por limitações na quantidade e qualidade de recursos pode restringir as chances de sobrevivência dos machos a apenas um determinado período do ano, favorecendo assim a evolução desta estratégia (MILLS AND BENCINI 2000, WOLFE *et al.*, 2004; BOONSTRA, 2005). Dimorfismo na massa e mudanças neste parâmetro e na condição corpórea (ao menos para machos) foram documentadas antes e durante o período reprodutivo para a maioria das

espécies de marsupiais semélparos estudadas (LEE AND COCKBURN, 1985; BRADLEY, 1997; OAKWOOD *et al.*, 2001; todavia ver WOODS AND HELLGREN, 2003). Estas alterações estão usualmente associadas ao acúmulo de reservas energéticas na forma de gordura antes do início da estação reprodutiva. Todavia, em algumas espécies, especialmente pequenos dasiurídeos dos gêneros *Antechinus* e *Phascogale*, a quantidade de gordura acumulada pode não ser suficiente para atender as altas demandas energéticas associadas à reprodução (LEE AND COCKBURN, 1985; BRADLEY, 1997; BOONSTRA, 2005). Esta situação é especialmente relevante para machos destas espécies que se reproduzem durante condições desfavoráveis em termos de disponibilidades e qualidade de recursos (BOONSTRA, 2005). Neste caso, a mudança na massa corpórea nos períodos que antecedem a reprodução também se dá por acúmulo de energia na forma de proteínas, a qual posteriormente é catabolizada via gluconeogênese dos tecidos magros (LEE AND COCKBURN, 1985; OAKWOOD *et al.*, 1991; BOONSTRA, 2005). Portanto, a variação na massa corpórea nestes animais está associada a variações na condição corpórea, com padrões distintos na dinâmica de acúmulo e uso de gordura e tecido magro que, aparentemente, dependem do estado reprodutivo e da disponibilidade de recursos.

Em didelfídeos a existência de semelparidade foi sugerida para poucas espécies como *Marmosa incana* (LORINI *et al.*, 1994), *Monodelphis dimidiata* (PINE, 1994), e *Didelphis virginiana* (WOODS AND HELGREEN, 2003). A partir de estudos de marcação e recaptura de uma população de *Gracilinanus microtarsus* em um ambiente sazonal (Cerrado), MARTINS (2004), verificou que a recaptura de machos diminui progressivamente ao longo do período reprodutivo e a existência de gerações discretas de machos, o que levou este autor a sugerir a existência de semelparidade para esta espécie (OAKWOOD *et al.*, 2001). Além do mais, MARTINS (2004) verificou um rápido e repentino ganho de massa corpórea em ambos os sexos em um curto espaço de tempo. Todavia, nenhum destes estudos documentou a contribuição relativa da quantidade de gordura e de tecido magro para esta mudança, e tampouco foi documentada como esta variação é afetada por fatores intrínsecos e

extrínsecos. Como forma de responder a estas questões, a dinâmica de variação na massa e na condição corpórea foi estudada em *Gracilinanus microtarsus*. Os objetivos específicos do presente estudo foram o de verificar os efeitos do sexo, condição reprodutiva, clima e disponibilidade de recursos sobre a variação no estado energético desta espécie.

2. Material e Métodos

2.1 Categorização da área de Estudo.

O presente estudo foi conduzido em um fragmento de cerradão de 307 ha localizado no município de Américo Brasiliense, (21°43'33"S, 48°01'07"W) entre janeiro e dezembro de 2004. A fisionomia de Cerrado do fragmento "cerradão" apresenta uma vegetação fechada do tipo floresta (GOODLAND, 1971; SILVA AND BATES, 2002), apresentando dossel predominantemente contínuo e cobertura arbórea que pode oscilar de 50% a 90%. A altura média do estrato arbóreo varia de 8 a 15 metros, proporcionando condições de luminosidade que favorecem a formação de estratos arbustivo e herbáceo diferenciados (RIBEIRO AND WALTER, 1998).

O clima da região foi classificado por TOLENTINO (1967) e PRIMAVESI *et al.* (1999) como sendo tropical de altitude, com duas estações bem definidas, a estação seca - fria que ocorre entre os meses de abril a setembro, e a estação úmida - quente que ocorre entre os meses de outubro a março. Dados sobre temperatura e precipitação para o ano de 2004, obtidos a partir do Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos de São Paulo (SIGRH) para a região de Araraquara (ca. 15km da área de estudo), indicam acentuada variação sazonal no clima da área (FIGURA 1A). A temperatura média permaneceu relativamente constante, e mais elevada, entre os meses de setembro a maio (média = $22,4 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$; amplitude: $20,9\text{-}23,9^{\circ}\text{C}$). A partir de maio, a temperatura diminuiu, sendo que os meses de Maio a Julho foram os mais frios (média: $13,2 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$; amplitude: $12\text{-}14,7^{\circ}\text{C}$). A precipitação basicamente esteve concentrada entre os meses de Dezembro a Fevereiro,

sendo que do total da precipitação anual da área (1403,25mm) cerca de 65% estiveram concentradas nestes meses.

Os dados obtidos a partir do SIGRH também foram utilizados para calcular o índice de aridez (Q) da área. Este índice, além de combinar informações sobre precipitação e temperatura, é uma medida indireta do grau de produtividade da área (TIELEMAN *et al.*, 2002). Originalmente, Q é calculado com base em dados históricos de precipitação e temperatura com base na fórmula $Q = P / ((T_{max} + T_{min})(T_{max} - T_{min})) \times 1000$, (TIELEMAN *et al.*, 2002) onde P = média da precipitação anual (mm), T_{max} = média da temperatura máxima do mês mais quente e T_{min} = média da temperatura mínima do mês mais frio. Para ajustar esta fórmula de forma a calcular Q em bases mensais para o ano de 2004, os valores de T_{max} e T_{min} são, respectivamente, os maiores e os menores valores de temperatura observados durante um determinado mês. Os valores de P foram associados à média mensal obtida para o mês em questão (dados obtidos a partir do banco de dados pluviométricos). Q tendem a ser baixo nos meses mais secos e quentes e aumentam à medida que o habitat se torna mais mésico. Como este aumento ocorre de forma rápida, o que poderia acarretar peso desproporcional nas análises, os dados de Q foram transformados em logaritmo antes das análises (TIELEMAN *et al.*, 2002). A adequação desta quantificação do clima foi analisada cotejando os dados em relação a divisão categórica sugerida por (PRIMAVESI *et al.*, (1999) e TOLENTINO (1967) para a região.

2.2. Captura dos Animais e Determinação da Condição Reprodutiva

Mensalmente, durante cinco noites consecutivas, entre os meses de janeiro a dezembro de 2004, realizamos um programa de captura-marcação-recaptura do marsupial *Gracilinanus microtarsus*. Os animais foram capturados em uma grade de captura de amostragem com 10 transecções com 100 metros de comprimentos eqüidistantes cerca de 10 metros entre si. Em cada transecção foram instaladas 10 estações de captura, cada uma contendo uma armadilha modelo Sherman, disposta a 2 metros de altura, totalizando 100 armadilhas/noite na grade de captura. Utilizamos óleo de fígado de bacalhau

(Emulsão Scott®), como isca para atração dos animais. Após a coleta, os animais eram imediatamente levados para o laboratório, pesados (precisão de 0,01 g - Balança Ohaus E200D) e registrados sexo e condição reprodutiva.

No tocante à condição reprodutiva, as fêmeas foram consideradas reprodutivas quando encontradas com os mamilos inchados ou produzindo leite e com a vagina perfurada (QUENTAL *et al.*, 2001). Com relação aos machos, registramos a posição do testículo. Os testículos dessa espécie de marsupial descem da bolsa escrotal ao atingirem a maturidade sexual, permanecendo nessa posição pelo resto da vida do animal (QUENTAL *et al.*, 2001).

Após a tomada destas medidas, os animais tiveram a condição corpórea aferida através do método da condutividade elétrica corpórea total (ver abaixo), foram marcados com anilhas plásticas numeradas e soltos no mesmo local de captura.

2.3 Condição Corpórea

Os protocolos existentes para análise de condição corpórea apresentam diversos problemas devido a sua natureza destrutiva, que limita o número de indivíduos analisados. Para contornar estes problemas, a condição corpórea foi analisada por meio da técnica conhecida por condutividade elétrica corpórea total (TOBEC®, no original). A TOBEC® se baseia na observação de que a condutividade de uma amostra biológica é determinada pelos eletrólitos corporais. Pelo fato dos ossos e dos lipídeos não conterem quantidades apreciáveis de água ou eletrólitos, eles não contribuem de forma significativa para a condutividade total (SCOTT *et al.*, 2001; ver Capítulo 1).

Assumindo um modelo de dois compartimentos (massa corpórea = massa magra + massa de lipídeos), a condição corpórea de cada indivíduo coletado foi estimada conforme os procedimentos descritos em detalhes no Capítulo 1. Usando as equações apropriadas, previamente descritas quando da calibração do método para esta espécie de marsupial (Capítulo 1), a quantificação da condutividade elétrica permitiu calcular a massa magra, sendo que a estimativa da quantidade de lipídeos foi feita subtraindo-se o valor da massa magra estimada da massa corpórea total do animal. Também

calculamos a quantidade de água corpórea pelo mesmo método, com a calibração sendo feita através da quantidade de água corpórea determinada pela secagem do homogeneizado usado na validação do método (Capítulo 1). Neste caso, a equação que melhor estima a quantidade de água corpórea (AC - em gramas) inclui o índice TOBEC® (IT) e a massa corpórea (MC) como variáveis independentes: $AC = -1,8 + 0,76*MC + 0,005*IT$ ($r^2 = 0,97$; $F_{2,19} = 276,5$; $P < 0,001$). O erro absoluto na estimativa de AC com este modelo é de apenas 0,09 gramas e o erro relativo foi de 9,5%.

2.4 Disponibilidade de Recursos: Coletas de Invertebrados e Frutas

Embora *G. microtarsus* seja classificada como tendo hábito preferencialmente arborícola, recente estudo sobre o hábito alimentar desta espécie demonstrou a ingestão de invertebrados que pertencem a ordens exclusivamente de hábitos cursoriais (MARTINS AND BONATO, 2004). Portanto, acessamos a disponibilidade mensal de invertebrados através de amostras coletadas ao nível de solo e ao nível do sub-bosque. Á nível do solo, a disponibilidade mensal de invertebrados foi estimada através de armadilhas de queda (“pitfall”), e a disponibilidade de insetos no sub-bosque foi acessada por meio de armadilhas luminosas.

Mensalmente 30 armadilhas de queda, eqüidistantes cerca de 10 metros entre si, foram montadas ao longo da grade de captura conforme procedimento descrito por BRIANI AND VIEIRA (in press). Além das armadilhas de queda, usamos armadilhas luminosas que consistiram de bandejas (40cm X 35cm) inter espaçadas em 20 metros, contendo solução de água e álcool (70%) e detergente, instaladas a uma altura de 3 metros com uma luz fluorescente em cada bandeja. O fornecimento de energia para as luzes fluorescentes foi feito através de uma bateria 12v. O índice de biomassa mensal de invertebrados no solo (IBsolo) e no sub-bosque (IBsb), ajustadas em função do tamanho da área (hectare), foram calculados com base nas fórmulas fornecidas por BRIANI AND VIEIRA (in press), e expressos com kg/ha de peso seco por mês.

Para obtermos uma amostragem representativa da disponibilidade mensal de frutos, eram escolhidas mensalmente três estações dentro da grade de captura. Depois destas estações, nós traçamos um quadrante de 100 m² tendo no centro de cada quadrante uma estação de captura. Amostras dos frutos presentes nessa área foram coletados e secos em estufa a 60°C e pesados. Foi calculado o valor médio de peso seco de frutas dessas três áreas como forma de se obter índice médio mensal de biomassa de frutos (peso seco), o qual também foi ajustado em função do tamanho da área (BRIANI AND VIEIRA, in press).

2.5 Manuseio e Análise dos Dados

O principal objetivo do estudo foi investigar a influência, isolada e sinérgica, de variáveis extrínsecas (sazonalidade do habitat, disponibilidade de recursos) e intrínsecas (sexo e condição reprodutiva) sobre a dinâmica de variação na massa corpórea de *G. microtarsus*. Nós elaboramos um modelo geral linear (MGL), onde a variável resposta era a massa corpórea, as variáveis preditoras categóricas eram o sexo e a condição reprodutiva e as variáveis preditoras contínuas eram a disponibilidade de recursos (invertebrados e frutos) e o índice de aridez do habitat. Apesar de termos coletado 118 indivíduos ao longo do ano (não contando as recapturas), estes modelos foram gerados a partir de valores médios mensais (obtidos em função do sexo e da condição reprodutiva), uma vez que somente foi possível coletar e analisar os dados sobre as variáveis extrínsecas em bases mensais.

Em princípio o modelo deveria conter todas as variáveis principais, as quais eram analisadas em separado, e também todas as possíveis interações de 2^a e 3^a ordem. Todavia, a necessidade de se utilizar dados em bases mensais reduziu o número de graus de liberdade e, portanto, não foi possível testar todas estas interações. Como forma de contornar este problema, e, além do mais, evitar possível colinearidade entre as variáveis preditoras contínuas, antes de gerar o modelo nós testamos *a priori* as correlações entre as variáveis contínuas. Uma vez decidido qual as interações a serem analisadas, nós removíamos do modelo as interações, com efeito, não significativo ($\alpha = 0,05$),

usando como critério os maiores valores de P (GETZ, *et al.*, 2005). Esse procedimento foi repetido até que todas as interações não significativas fossem retiradas do modelo. O MGL final continha, portanto, os efeitos de todas as variáveis principais em separado, e os efeitos significativos de suas interações de 2ª e 3ª ordem. No caso de interações significativas de que envolviam uma variável contínua, nós examinamos a relação linear, através de regressão com modelo I, entre massa corpórea e a variável em questão, para cada nível de variável categórica envolvida na interação. Análises de variância foram utilizadas para examinar as interações que envolviam somente variáveis categóricas.

Modelos gerais lineares também foram elaborados para verificar os fatores responsáveis pela variação na MM e ML. Análises prévias dos resultados demonstraram uma concordância entre os resultados obtidos com estes modelos em relação ao modelo gerado para analisar a MC (i.e. as variáveis que afetam a MM e ML, além de suas interações, foram às mesmas observadas para a MC). Portanto, nós optamos por não apresentar os resultados destes modelos. Devido à maneira pela qual os dados de MG e ML foram obtidos (ver Capítulo 1), não foi possível usar os procedimentos padrões para estimar o quanto da dinâmica de variação na MC era devido mudança na MM e na ML (van der MEER AND PIERSMA, 1994). Alternativamente, nós procuramos determinar a contribuição relativa e absoluta da MM e ML para a variação na MC para cada nível de variável categórica que se mostraram significantes no MGL. Para podermos testar esta relação em função da estação do ano, nós usamos a categorização dicotômica estação quente-estação úmida ao invés da categorização contínua fornecida pelo índice de aridez. Note que comprovamos previamente que o índice Q indexa de forma acurada esta divisão dicotômica e, portanto, acreditamos que as conclusões não sofreram viés devido a este protocolo. Note também que ao usarmos esta categorização, foi possível utilizar os valores individuais, ao invés dos valores médios mensais, o que permitiu aumentar o grau de liberdade das análises. Todavia, mesmo nestas condições, o tamanho amostral é substancialmente reduzido ($n < 10$) para analisar as interações entre período, sexo e condição reprodutiva,

especialmente para fêmeas (ver FIGURA 3). Portanto, as análises da contribuição absoluta da ML e MM foram feitas em função somente de cada variável categórica em separado e em função da interação entre sexo e condição reprodutiva. Comparações dos valores absolutos entre os níveis de variáveis categóricas foram conduzidas através de análises de variância, e análises de covariância (com MC como covariável) foram utilizadas para acessar diferenças na contribuição relativa da ML e MM para a MC entre estes mesmos níveis. Valores relativos foram transformados em arco-seno antes das análises.

Todas as análises estatísticas seguiram SOKAL AND ROHLF (1995) e foram feitas utilizando os módulos Modelos Gerais Lineares e Modelos Gerais de Regressão do pacote estatístico STATISTICA 6.0 (STAT-SOFT, 2000). Os resultados são apresentados como médias $\pm$ 1 desvio padrão, e utilizamos um nível de 0,05 para acessar a significância dos testes utilizados.

3. Resultados

3.1 Sazonalidade Climática e Disponibilidade de Recursos

Em consonância com a sazonalidade observada para a temperatura e precipitação, o índice de aridez (Q) variou de forma acentuada ao longo do ano (Figura 1A). Q é maior entre os meses de novembro a fevereiro, diminui de forma rápida, atingindo seu menor valor no mês de agosto, a partir do qual volta a subir até atingir seu nível máximo em dezembro. Usando a categorização prévia da área como base de comparação (estação seca-fria: abril a setembro; estação úmida-quente: outubro a março - PRIMAVESI *et al.*, 1999; TOLENTINO, 1967), o valor médio de logQ para a estação categorizada como úmida é de $2,79 \pm 0,58$ (n = 6) e para a estação categorizada como seca o valor médio de logQ é $1,02 \pm 0,36$ (n = 6), uma diferença estatisticamente significativa (t = 6,3; df = 10; P < 0,001). Além do mais, em bases mensais, o valor médio de logQ é correlacionado com a temperatura média mensal (r = 0,76; P = 0,004) e com a precipitação total mensal (r = 0,86; P < 0,0001).

A disponibilidade de recursos apresentou variação sazonal na área de estudo, mas com padrão diferenciado (Figura 1B e 1C). A biomassa de frutas (BF) apresentou dois picos de produtividade, um nos meses de março a junho e outro pico nos meses de agosto e setembro. A biomassa total de invertebrados (BI) apresentou um valor máximo no mês de novembro, diminuindo progressivamente até atingir um valor mínimo no mês de julho. Modelos de regressão dos melhores sub-conjuntos foram utilizados para determinar quais variáveis (logQ, temperatura média e precipitação total mensal) melhor explicavam a variação na biomassa dos recursos. Para a BF, o melhor modelo incluía logQ e temperatura média mensal e explicou 76% da variabilidade na BF ($R^2 = 0,76$; $F_{2,11} = 14,2$; $P = 0,002$). Neste modelo, ambas as variáveis contribuíram de forma significativa para a regressão, mas a contribuição relativa de logQ ($P < 0,001$; negativa) foi substancialmente maior do que a contribuição da temperatura média mensal ($P = 0,03$; positivo). Com relação a BI, o melhor modelo incluiu logQ e temperatura média mensal e explicou 58% da variabilidade na BI ($R^2 = 0,58$; $F_{2,11} = 6,3$; $P = 0,02$). Todavia, o efeito da precipitação total mensal não explicou uma fração significativa da BF ($P = 0,184$), após os efeitos significativos de logQ ($P = 0,02$; positivo) terem sido controlados. Pelos resultados apresentados, o índice de aridez indexa de forma acurada as variações climáticas da área de estudo, além de explicar uma substancial proporção da produtividade. Este efeito de logQ sobre BI e BF parece ser um efeito direto e independente, uma vez que não observamos correlação entre BI e BF ($r = -0,38$; $P = 0,2$), mesmo quando os efeitos comuns de logQ foram controlados (correlação entre resíduos de BI*logQ e BF*logQ: $r = 0,02$; $P = 0,82$).

3.2 Padrões Reprodutivos

Ao longo do período de estudo obtivemos 188 capturas de indivíduos adultos de *G. microtarsus*, sendo 83 capturas de fêmeas e 105 de machos. Do total de captura de fêmeas, 29 foram recapturas de 21 indivíduos e do total de capturas de machos, 32 foram recapturas de 14 indivíduos. O período reprodutivo teve início no último mês da estação seca e término no mês de

fevereiro (Figura 2). O número de indivíduos adultos de machos reprodutivos ($N=12$) no início do período foi maior do que o número de fêmeas ($N=3$). Machos adultos reprodutivos não foram registrados ao final do período reprodutivo (fevereiro), no entanto as fêmeas apresentaram sobreposição de coorte, pois fêmeas reprodutivas e não reprodutivas foram registradas nesse período.

3.3 Variabilidade na Massa Corpórea, Massa Magra e Massa de Lipídeos

A massa corpórea (MC), massa magra (MM) e de lipídeos (ML), apresentaram acentuadas, e similares variações sazonais (Figura 3). O modelo geral linear usado para testar os efeitos do sexo, condição reprodutiva, disponibilidade de recursos (BI e BF) e Q sobre a variação na MC analisou os efeitos destas variáveis em separado. Para as interações, contudo, excluimos todas as de 2° e 3° ordem que incluíam, conjuntamente, Q e BF. Conforme explicado anteriormente (ver manuseio e análise dos dados), esse procedimento foi tomado como forma de contornar o problema do número de graus de liberdade no modelo, e foi baseado no fato de que Q explica 40% da variação em BF, o que poderia introduzir colinearidade, caso estas duas variáveis entrassem em conjunto no modelo.

A análise do MGL resultante (Tabela 1) indicou que a MC variou, de forma independente, da condição reprodutiva (MC é, em média, maior quando os indivíduos estão reprodutivos – indivíduos reprodutivos e não reprodutivos: $25,47 \pm 3,81$ g e $16,89 \pm 2,63$), de Q (massa tende a aumentar à medida que o ambiente se torna mais úmido, i.e., MC é, em média, maior na época úmida que na seca – indivíduos na estação úmida e na seca: $21,28 \pm 6,23$ g e $18,4 \pm 4,20$ g) e de BI (MC tende a aumentar quando há aumento na disponibilidade de invertebrados). A BF, de forma independente, não afeta a variação em MC. O modelo resultante também incluiu uma interação significativa de 3° ordem, envolvendo o sexo a condição reprodutiva e BI. A interação entre sexo e condição reprodutiva demonstra que (massa corpórea é, em média, maior quando os indivíduos estão reprodutivos – machos reprodutivos e não

reprodutivos: $26,47 \pm 5,3g$ e $17,61 \pm 2,04 g$; fêmeas reprodutivas e não reprodutivas: $24,48 \pm 2,33$ e $16,17 \pm 3,23$). Todavia esta interação depende da quantidade de invertebrados disponível no ambiente. A MC de machos não é constante durante os períodos não-reprodutivo ($F_{5,65} = 17,6$; $P < 0,0001$) e reprodutivo ($F_{3,24} = 19,4$; $P < 0,0001$). Na época não reprodutiva a MC tende a aumentar gradualmente a partir de março, atingindo um valor máximo em agosto (Figura 3). Paradoxalmente, este aumento na MC é negativamente influenciado pela BI (Tabela 2). Já na estação reprodutiva, a MC tende a diminuir gradativamente à medida que a estação procede (Figura 3), mas esta queda independe da variação na BI, a qual explica somente 39% da variação na MC observada neste período (Tabela 2). Apesar das fêmeas manterem a MC constante ao longo do período não reprodutivo ($F_{5,55} = 0,17$; $P = 0,97$), uma grande parte da variação na MC neste período se deve a variação na BI (Tabela 2). Após o aumento na MC associado ao início do período reprodutivo (Figura 3), também não foi observada variação na MC ao longo deste período ($F_{4,20} = 0,84$; $P = 0,52$). Variação na BI explica somente 36% da variação na MC para fêmeas durante o período reprodutivo (Tabela 2).

Conforme esperado, em termos absolutos, a MM e a ML são maiores, em machos quando comparado às fêmeas. Todavia, em termos relativos, a contribuição da MM e da ML para a MC não difere entre os sexos (Tabela 3). Considerando apenas o período reprodutivo, em termos absolutos, a MM e a ML são maiores durante a estação reprodutiva. Em termos relativos, a contribuição da MM e da ML para a MC diferiu entre o período reprodutivo e não reprodutivo (Tabela 3).

A MM e a ML, em termos absolutos, são maiores durante a estação úmida quando comparado com a estação seca. Em termos relativos, a contribuição da MM e da ML para a MC diferiu entre as estações. Por fim, considerando a interação entre período reprodutivo e sexo, em termos absolutos, a MM e a ML são maiores nos machos reprodutivos em comparação as fêmeas reprodutivas. Em termos relativos, a contribuição da MM e da ML para a MC de machos e fêmeas não diferiu durante o período reprodutivo (Tabela 3). Durante o período não reprodutivo, em termos absolutos a MM e a

ML são também maiores nos machos não-reprodutivos em comparação as fêmeas não-reprodutivas. Em termos relativos, a contribuição da MM e da ML para a MC de machos e fêmeas não diferiu durante o período não-reprodutivo (Tabela 3).

4. Discussão

A dinâmica da condição corpórea de *Gracilinanus microtarsus* apresentou acentuadas variações sazonais. Tais variabilidades na MC, aparentemente foram induzidas tanto por fatores intrínsecos (sexo e condição reprodutiva) como por fatores extrínsecos como época do ano (Q) e biomassa de invertebrados (BI) (Tabela 1). O uso da variabilidade da MC como indicador da condição de um indivíduo, é em mamíferos bem documentada (MERRIT *et al.*, 2001; PEACOCK *et al.*, 2004; LI AND WANG, 2005; LOVEGROVE, 2005; KWIECINSK *et al.*, 1987; CAUGHTLEY AND SINCLAIR, 1994, HARDER *et al.*, 1996; REYNOLDS AND KUNZ, 2000; KROCKENBERGER, 2003).

Embora a MC varie em função dos fatores acima, o modelo final proposto, incluiu uma interação entre sexo, condição reprodutiva que depende da BI. Embora tal relação dependa da BI ela é negativa no período não reprodutivo, podendo ser em partes explicada pelo aumento do consumo de frutas nesse período. Por outro lado a BI aumenta substancialmente na estação úmida juntamente com o período reprodutivo (Figura 3), o que corrobora com diversos estudos realizados com marsupiais neotropicais onde há uma alta relação entre ganho de massa corpórea, atividade reprodutiva e estação úmida (FLEMING, 1973; O'CONNEL, 1979; QUENTAL *et al.* 2001), vista como um período de abundância de recursos.

Nossos resultados mostraram que a MM e a ML variaram de forma similar à MC de *G. microtarsus*. Como vimos anteriormente, variações na MC podem ser decorrentes de modificações na condição corpórea do animal. A MM e a ML, atingiram maiores valores médios ao longo da estação úmida coincidentemente com a metade do período reprodutivo (Figura 3). Machos e fêmeas apresentaram um decréscimo tanto da MC como da MM e da ML ao

longo do período reprodutivo. Os menores valores médios foram registrados ao final da estação seca, permanecendo constante por quase todo período não reprodutivo ao longo desta estação, com exceção do mês de setembro (início do período reprodutivo) (Figura 2).

Em termos absolutos a contribuição da MM e da ML, apenas diferiu entre sexo, e não diferiu em nenhuma das outras condições testadas (período reprodutivo e estação do ano). Quando consideramos a interação entre sexo e período reprodutivo, notamos que em termos absolutos, a MM e a ML de machos são sempre maiores que das fêmeas, independente da condição reprodutiva. Entretanto, em termos relativos não há diferença significativa entre sexo em ambos períodos. Considerações sobre provável dimorfismo e mudanças na MC e na condição corpórea (pelo menos em machos) foram bem documentadas antes e depois do período reprodutivo para muitas espécies de marsupiais semélparos (LEE AND COCKBURN, 1985; BRADLEY, 1997; OAKWOOD *et al.*, 2001; WOODS AND HELLGREN, 2003). Para esses animais as alterações da MC estão associadas ao acúmulo de reservas energéticas em forma de gordura antes e no início do período reprodutivo. Durante o evento reprodutivo, se os animais não tenham condições de repor a energia gasta, então a energia estocada em forma de reservas provavelmente deva ser usada para maximizar o esforço reprodutivo, levando-os a perda da MC durante a reprodução. Além de disso, quando o dispêndio de energia é maior do que a energia que pode ser mobilizada a partir das reservas energéticas, então o animal passa a utilizar outras fontes de energia corpórea como, por exemplo, proteínas.

Esse fato é comum em algumas espécies de pequenos marsupiais dasiurídeos semélparos dos gêneros *Antechinus* e *Phascogale*, onde a quantidade de gordura acumulada não é o suficiente para atender as altas demandas energéticas associadas à reprodução (LEE AND COCKBURN, 1985; BRADLEY, 1997; BOONSTRA, 2005). Esta situação é especialmente relevante para machos de espécies que se reproduzem durante condições desfavoráveis em termos de disponibilidades e qualidade de recursos (BOONSTRA, 2005), o que difere de *G. microtarsus* e de outras espécies neotropicais que se

reproduzem na estação úmida quando há maior disponibilidade de recursos no ambiente (FLEMING, 1973; O'CONNEL, 1979; QUENTAL *et al.*, 2001).

Para fêmeas o aumento especificamente do nível de gordura e o ajuste da estação reprodutiva ao período de abundância de alimentos são uma estratégia que propicia maior sucesso reprodutivo às fêmeas uma vez que a gestação e a lactação são eventos energeticamente dispendiosos em marsupiais (HARDER *et al.*, 1996; KROCKENBERGER, 2003). Dessa forma, a quantidade de energia adquirida através da dieta pode determinar a energia disponível para a reprodução, de maneira que variações na disponibilidade de recursos podem afetar as estratégias reprodutivas dos indivíduos (BRAITHWAITE AND LEE, 1979), conseqüentemente afetando a condição corpórea do animal.

Por outro lado, a mudança na massa corpórea nos períodos que antecedem a reprodução também pode se dar por acúmulo de energia na forma de proteínas, a qual posteriormente é catabolizada via gluconeogênese dos tecidos magros (LEE AND COKBURN, 1985; OAKWOOD *et al.*, 1991; BOONSTRA, 2005). Portanto, a variação na massa corpórea nestes animais está associada a variações na condição corpórea, com padrões distintos na dinâmica de acúmulo e uso de gordura e tecido magro que, aparentemente, dependem do estado reprodutivo e da disponibilidade de recursos. Para *G. microtarsus*, cuja dinâmica da MC, se dá através de um rápido e repentino aumento em um curto espaço de tempo, a variação estaria relacionada à variabilidade da condição corpórea, associada ao período reprodutivo e a disponibilidade de recursos. Então nesse caso, muito provavelmente a perda de MC em *G. microtarsus* pode ser tanto devido à perda de ML como de MM.

Um outro fato que constatamos com nossos dados de captura e recaptura (Figura 2), e que reforça a hipótese de uma provável estratégia de vida semélpara, é o súbito desaparecimento dos machos após o período reprodutivo. Para algumas espécies de marsupiais dasiurídeos, além de uma provável predisposição filogenética (OAKWOOD *et al.*, 2001), a sazonalidade do ambiente traduzida por limitações na quantidade e qualidade de recursos restringe as chances de sobrevivência dos machos a apenas um determinado

período do ano, favorecendo assim a evolução da semelparidade (MILLS AND BENCINI 2000, WOLFE *et al.*, 2004; BOONSTRA, 2005).

Em resumo, nosso estudo explorou e registrou a dinâmica da MC mostrando que sua variabilidade esta associada a fatores intrínsecos (sexo e condição reprodutiva) e também a fatores extrínsecos (disponibilidade de recursos nesse caso representada pela biomassa de invertebrados). Contudo, como mostramos anteriormente, a variação da MC pode refletir a variabilidade da condição corpórea associada a ajustes adaptativos nas estratégias de vida, de *G. microtarsus*, como, por exemplo, a provável existência de semelparidade, já sugerida para a espécie (MARTINS, 2004) e para outros didelfídeos como *Marmosa incana*, *Monodelphis dimidiata* e *Didelphis virginiana* (LORINI *et al.*, 1994; PINE, 1994; WOODS AND HELGREEN, 2003).

5. Agradecimentos

Agradeço a paciência e orientação do Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto e pelos bons momentos durante todo o doutorado. A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho. O estudo teve suporte financeiro da FAPESP (proc. 00/09968-8) e bolsa de estudo do CNPQ – proc. 140245/2003-0.

6. Literatura Citada

- BACHMAN, G. C. 1994. Food restriction effects on the body composition of free-living ground squirrels. *Physiological Zoology* 67:756-770.
- BACHMAN, G. C., WIDEMO, F. 1999. Relationships between body composition, body size, and alternative reproductive tactics in a lekking sandpiper, the Ruff (*Philomachus pugnax*). *Functional Ecology*: 13: 411-416.
- BINTZ, G. L. 1985. Radioglucose metabolism by Richardson's grounds squirrel in the weight-gain and weight-loss phases of circannual cycle. *Journal of Comparative Physiology* 156B:87-93
- BOONTRA, R. 2005. Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Zoology*. 86(2): 236-247.
- BRADLEY, A. J. 1997. Reproduction and life in the red-tailed phacogale, *Phascogale calura* (Marsupialia: Dasyuridae): the adaptative-stress senescence hypotesis. *Journal of Zoology*. 241:739-755.
- BRAITHWAITE, R. W. AND LEE, A. K. 1979. A mammalian example of semelparity. *The American Naturalist* 113:151-155.
- BRIANI, D. C. AND VIEIRA, E. M. (in press). Efeito do fogo em Mamíferos do Brasil. In: FREITAS, T.O; CHRISTOFF, A. R.; PACHECO, S. M. VIEIRA, E. M. (ed.). *Sistemática, Evolução, Ecologia e Conservação de Mamíferos Neotropicais*.
- CAUGHLEY, G. AND SINCLAIR, R. E. 1994. *Wildlife ecology and management*. Blackwell Scientific Publications, Boston, Massachusetts.
- FLEMING, T. H. 1973. The reproductive cycles of three species of opossums and other mammals in the Panama Canal zone. *Journal of Mammalogy* 54:439-455.
- GETZ, L. L., OLI, M. K., HOFMAN, J. E., MCGUIRRE, B. AND OZGUL, A. 2005. Factor influencing movement distance of two species of sympatric voles. *Journal of Mammalogy*. 86(4):647-654.
- GOODLAND, R. J. 1971. A physiognomic analysis of the "cerrado vegetation" of Central Brazil. *Journal of Ecology*, 59: 411-419.

- GREEN, A. J. 2001. Mass/Length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology*. 82:1473-1483.
- HARDER, J. D.; HSU, M. J. AND GARTON, D. W. 1996. Metabolic rates and body temperature of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) during gestation and lactation. *Physiological Zoology* 69:317-339
- KARASOV, W. H. AND PINSHOW, B. 1998. Changes in lean mass and in organs of nutrient assimilation in a long-distance passerine migrant at a springtime stopover site. *Physiological Zoology* 71:435-448.
- KROCKENBERGER, A. 2003. Meeting the energy demands of reproduction in females koalas, *Phascolarctos cinereus*: evidence for energetic compensation. *Journal of Comparative Physiology B* 173:531-540.
- KWIECINSK, G. G., KROOK, L. AND WIMSATT, W. A. 1987. Annual skeletal changes in the little brown bat, *Myotis lucifugus*, with particular reference to pregnancy and lactation. *American Journal of Anatomy*, 178:410-420.
- LEE, A. K. AND COCKBURN, A. 1985A. *Evolutionary Ecology of Marsupials*. Cambridge: Cambridge University Press.
- LI, X. S. AND WANG, D. H. 2005. Seasonal adjustments in body mass and thermogenesis in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*): the roles of short photoperiod and cold. *J. Comp. Physiol B*. 175: 593-600.
- LIMA M., BOZINOVIC, F. AND JAKSIC, F. M. 1997. Body mass dynamics and growth patterns of leaf-eared mice *Phyllotis darwini* in a semi-arid region of Neotropics. *Acta Theriologica*. 42(1):5-24.
- LINDSTEDT, S. L. AND BOYCE, M. S. 1985. Seasonality, fasting endurance, and body size in mammals. *American Naturalist*. 125:873-878.
- LORINI, M. L.; DE OLIVEIRA, J. A. AND PEARSON, V. G. 1994. Annual age structure and reproductive patterns in *Marmosa incana* (Lund, 1841) (Didelphidae, Marsupialia). *Z. Säugetierkd*. 59: 65-73.
- LOVEGROVE, B. G. 2005. Seasonal thermoregulatory responses in mammals. *J. Comp. Physiol B*. 175:231-247.

- MARTINS, E. G. and BONATO, V. 2004. On the diet of *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia, Didelphidae) in a Atlantic Rainforest fragment in southeastern Brazil. *Zeitschrift für Säugetierkunde (Mammalian Biology)*, 69: 58-60.
- MARTINS, E. G. 2004. Ecologia populacional e área de vida da cuíca *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia: Didelphidae) em um Cerradão de Américo Brasiliense, São Paulo. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.
- MERRITT, J. F.; ZEGERS, D. A. AND ROSE, L. R. 2001. Seasonal thermogenesis of southern flying squirrels (*Glaucomys volans*). *J. Mammal.* 82:51-64.
- MILLS, R. H. AND BENCINI, R. 2000. New evidence for facultative male die-off in island populations of dibblers, *Parantechinus apicalis*. *Australian journal of Zoology.* 48:501-510.
- OAKWOOD, M.; BRADLEY, A. J. AND COCKBURN, A. 2001. Semelparity in a large marsupial. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268: 407-411.
- O'CONNELL, M. A. 1979. Ecology of didelphid marsupials from Northern Venezuela. In: *Vertebrate Ecology in the Northern Neotropics* (Eisenberg, J.F, ed.). Smithsonian Press, Washington, DC.
- PEACOCK, W. L.; KRÓL, E.; MOAR, K. M.; MCLAREN, J. S.; MERCER, J. G.; SPEAKMAN, J. R. 2004. Photoperiodic effects on body mass, energy balance and hypothalamic gene expression in the bank vole. *J. Exp. Biol.* 207:165-177.
- PIERCE, B. J., MCWILLIAMS, S. R., O'CONNOR, T. P., PLACE, A. R. AND GUGLIELMO, C. G. 2005. Effect of dietary fatty acid composition on depot fat and exercise performance in a migrant songbird, the red-eyed viro. *Journal of Experimental Biology* 208:1277-1285.
- PINE, R. 1994. Sex and death. *Aust. Nat. Hist.* 24:4.
- PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C. P. A.; PEDROSO, A. F.; CAMARGO, A. C.; RASSINI, J. B.; ROCHA-FILHO, J.; OLIVEIRA, G. P.; CORREA, L. A.; ARMELIN, M. J. A.; VIEIRA, S. R.; DECHEN, S. C. F. 1999. Microbacia Hidrográfica do Ribeirão

- Canchim: um modelo real de Laboratório Ambiental. Boletim de Pesquisa, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 133 p.
- QUENTAL, T. B., FERNANDEZ, F. A. S., DIAS, A. T. C. AND ROCHA, F. S. 2001. Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 17:339-352.
- REYNOLDS, D. S. AND KUNZ, T. H. 2000. CHANGES IN BODY COMPOSITION DURING REPRODUCTION AND POSTNATAL GROWTH IN THE LITTLE BROWN BAT, *MYOTIS LUCIFUGUS* (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE). 7(1): 10-17.
- RIBEIRO, J. F. AND WALTER, B. M. T. 1998. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. *In: Cerrado: Ambiente e Flora*. Sano, S. M. & Almeida, S. P. (eds.) Planaltina, DF. Embrapa. 556p.
- ROFF, D. A. 2002. Life history evolution, Sinauer Associates.
- SCHULTE-HOSTEDDE, A. I., MILLAR, J. S. AND HICKLING, G. J. 2001. Evaluation of body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology* 79:1021-1-29.
- SCHULTE-HOSTEDDE, A. I., B. ZINNER, J. S. MILLAR AND G. J. HICKLING. 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86: 155-163.
- SCOTT, I., SELMAN, C., MITHCELL, P. I. AND EVANS, P. E. 2001. THE USE OF TOTAL BODY ELECTRICAL CONDUCTIVITY (TOBEC®) TO DETERMINATE BODY COMPOSITION IN VERTEBRATES. PP. 127-157 IN BODY COMPOSITION ANALYSIS OF ANIMALS: A HANDBOOK OF NON-DESTRUCTIVE METHODS. (J. R. SPEAKMAN, ED.). CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE.
- SILVA, J. M. C. AND BATES, J. M. 2002. Biogeographic patterns and coservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*, 52: 225-233.

- SOKAL, R. R. AND ROHLF, F. J. 1995. BIOMETRY: THE PRINCIPLES AND PRACTICE OF STATISTICS IN BIOLOGICAL RESEARCH. 3 ED. FREEMAN AND COMPANY. 850P.
- STEARNS, S. C. 1992. Evolution of life histories. Oxford University Press, New York.
- TIELEMAN, B. I., WILLIAMS J. B. AND BLOOMER P. 2002. Adaptation of metabolism and evaporative water loss along an aridity gradient. Proc. Royal Society London. 270:207-214.
- TOLENTINO, M. 1967. Estudo Crítico sobre o Clima da Região de São Carlos. Prefeitura Municipal de São Carlos, 78 p.
- VAN DER MEER, J. AND PIERSMA, T. 1994. Physiologically inspired regression models for estimating and predicting nutrient and their composition in birds. Physiological Zoology. 67(2): 305-329.
- WOLFE, K. M.; MILLS, H. R.; GARKAKLIS, M. J. AND BENCINI, R. 2004. Post-mating survival in a small marsupial is associated with nutrient inputs from seabirds. Ecology. 85(6): 1740-1746.
- WOODS II, H. A. AND HELLGREEN, E. C. 2003. Seasonal changes in the physiology of male Virginiana Opossums (*Didelphis virginiana*): Signs of the Dasyurid Semelparity Syndrome?. Physiological and biochemical Zoology. 76(3): 406-417.

Tabela 1. Resultado final do Modelo Geral Linear mostrando os efeitos das variáveis categóricas (sexo e condição reprodutiva) e contínuas (aridez, biomassa de invertebrados e de frutas) sobre a variabilidade na massa corpórea de *Gracilinanus microtarsus*. O modelo foi significativo e explicou 91% da variação na massa corpórea ($F = 45,43$; $df = 7$; $r^2 = 0,91$; $P < 0,0001$). Ver texto para determinação das variáveis independentes e interações.

Variáveis	F	P
Sexo	5,45	0,03
Condição Reprodutiva	81,17	<0,001
Aridez (Q)	14,47	0,01
Biomassa de Fruta (BF)	0,58	0,456
Biomassa de Invertebrados (BI)	9,65	0,006
Sexo X Condição Reprodutiva X BI	11,62	0,003

Tabela 2. Regressão linear entre biomassa de invertebrados e massa corpórea para cada nível das variáveis categóricas: sexo (M = machos; F = fêmeas) e condição reprodutiva.

Condição Reprodutiva	Sexo	Intercepto	Inclinação	R²	P
Não Reprodutivo	M	19,14	-0,04	0,68	0,01
	F	16,77	-0,02	0,63	0,01
Reprodutivo	M	24,6	0,01	0,39	0,25
	F	23,4	0,002	0,36	0,28

Tabela 3. Contribuição absoluta e relativa da massa magra (MM) e da massa de lipídeos (ML) para a massa corpórea (MC) de *Gracilinanus microtarsus*. As variáveis categóricas são subdivididas em sexo, condição reprodutiva e estação do ano e interação entre machos reprodutivos X fêmeas reprodutivas e machos não-reprodutivos X fêmeas não-reprodutivas.

Variáveis Categóricas	MM	ML	%MM	%ML
Macho	19,2±4,9; F=5,97; P=0,02	1,18±1,18; F=4,97; P=0,03	94,6±1,8; F=0,48; P=0,58	5,3±1,8; F=0,3; P=0,58
Fêmea	17,5±4,2; F=5,97; P=0,02	0,94±0,6; F=4,97; P=0,03	95,3±2,1; F=0,48; P=0,58	4,6±1,8; F=2,1; P=0,59
Repr.	24,2±4,05; F=237,3; P<0,0001	1,98±0,64; F=2,82; P<0,0001	92,6±1,4; F=4,08; P=0,02	7,3±1,4; F=5,5; P=0,005
N. Repr.	16,2±2,49; F=237,3; P<0,0001	0,73±0,32; F=2,82; P<0,0001	95,8±1,4; F=4,08; P=0,02	4,1±1,3; F=5,5; P=0,005
Seca	17,7±4,03; F=8,4; P=0,004	0,94±0,61; F=13,7; P=0,0003	95,3±1,9; F=4,8; P=0,03	4,6±1,9; F=6,2; P=0,01
Úmida	19,9±5,6; F=8,4; P=0,004	1,36±0,81; F=13,7; P=0,0003	94,1±1,9; F=4,8; P=0,03	5,9±2; F=6,2; P=0,01
Macho Rep.	25,3±4,8; F=5,22; P=0,03	2,15±0,7; F=4,39; P=0,04	92,4±1,4; F=1,22; P=0,27	7,6±1,4; F=0,86; P=0,4
Fêmea Rep.	22,7±1,9; F=5,22; P=0,04	1,8±0,5; F=4,39; P=0,04	92,9±1,2; F=1,22; P=0,27	7,1±1,2; F=0,86; P=0,4
Macho Nrep	16,8±2; F=8,66; P=0,004	0,8±0,26; F=9,11; P=0,003	95,5±1,2; F=2,54; P=0,11	4,5±1,2; F=2,73; P=1,01
Fêmea Nrep	15,5±2,9; F=8,66; P=0,004	0,63±0,4; F=9,11; P=0,003	96,2±1,5; F=2,54; P=0,11	3,7±1,5; F=2,73; P=1,01

Legenda das Figuras

Figura 1. Variação sazonal da temperatura e pluviosidade (A). Disponibilidade de fruto e Índice de aridez ao longo do ano (B). Disponibilidade de Invertebrados e Índice de aridez ao longo do ano (C).

Figura 2. Número de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos ao longo do ano. As barras horizontais escuras representam a estação úmida e a barra clara ao centro representa a estação seca (PRIMAVESI et al. 1999).

Figura 3. Variação na massa corpórea (A), massa magra (B) e massa de lipídeos (C) de machos (barras verticais claras) e fêmeas (barras verticais escuras) de *Gracilinanus microtarsus*. As barras horizontais escuras representam a estação úmida e a barra clara ao centro representa a estação seca. O período reprodutivo está representado pelas barras horizontais com linhas diagonais e o período não reprodutivo pela barra com linhas verticais ao centro.

Figura 1.

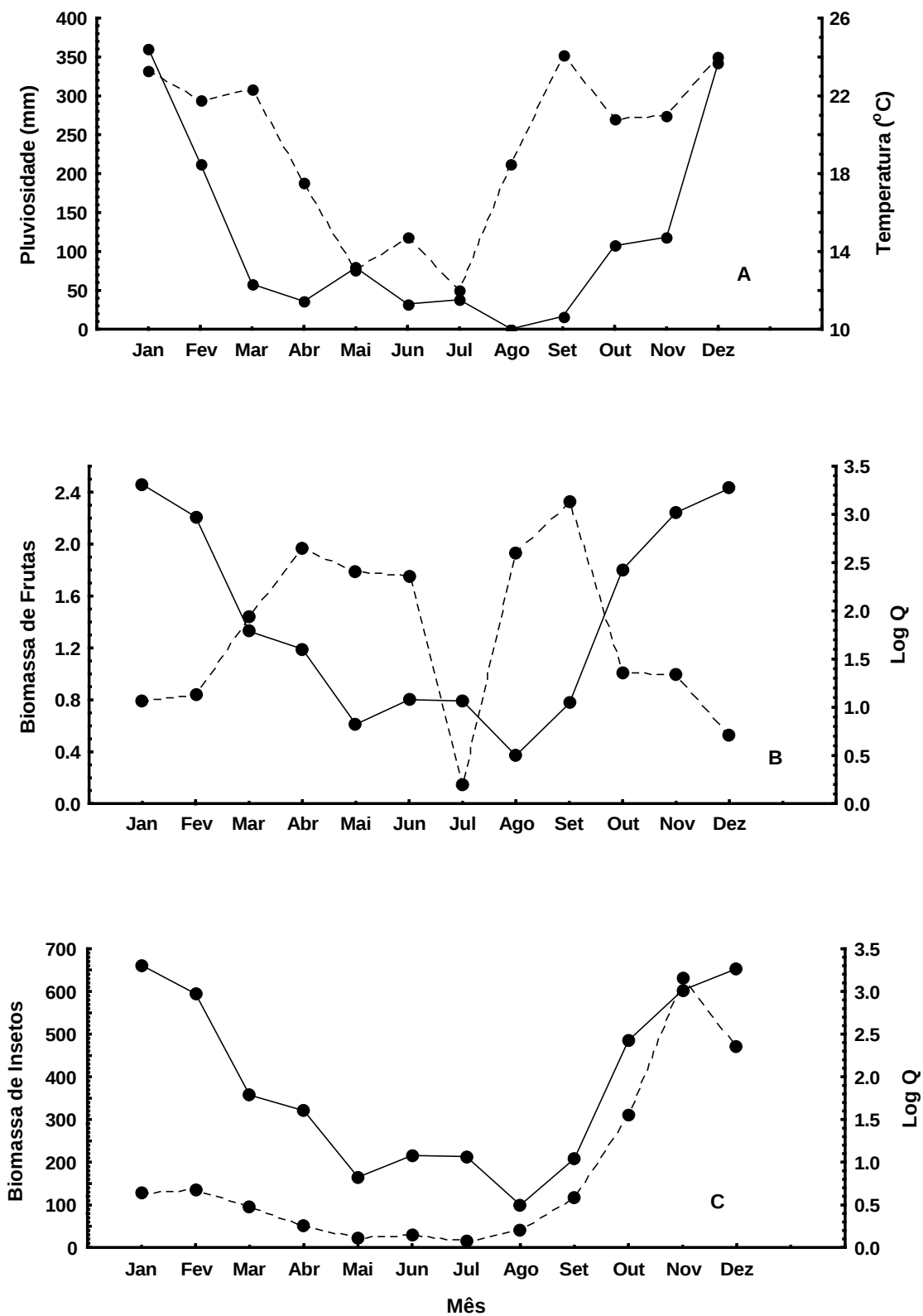


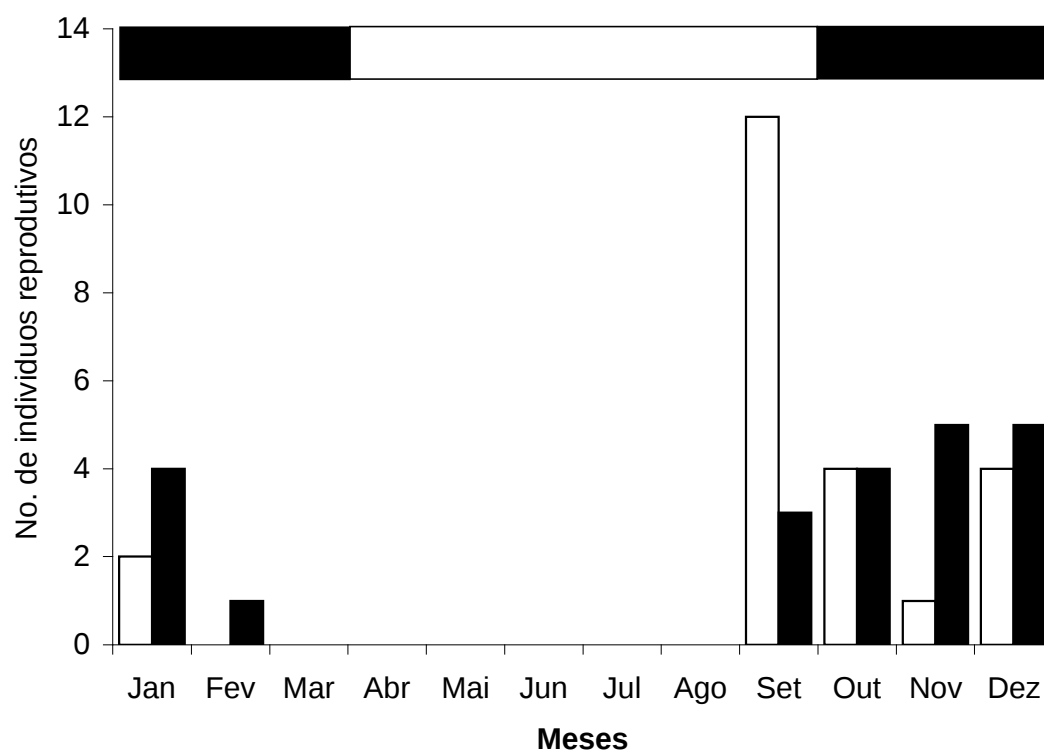
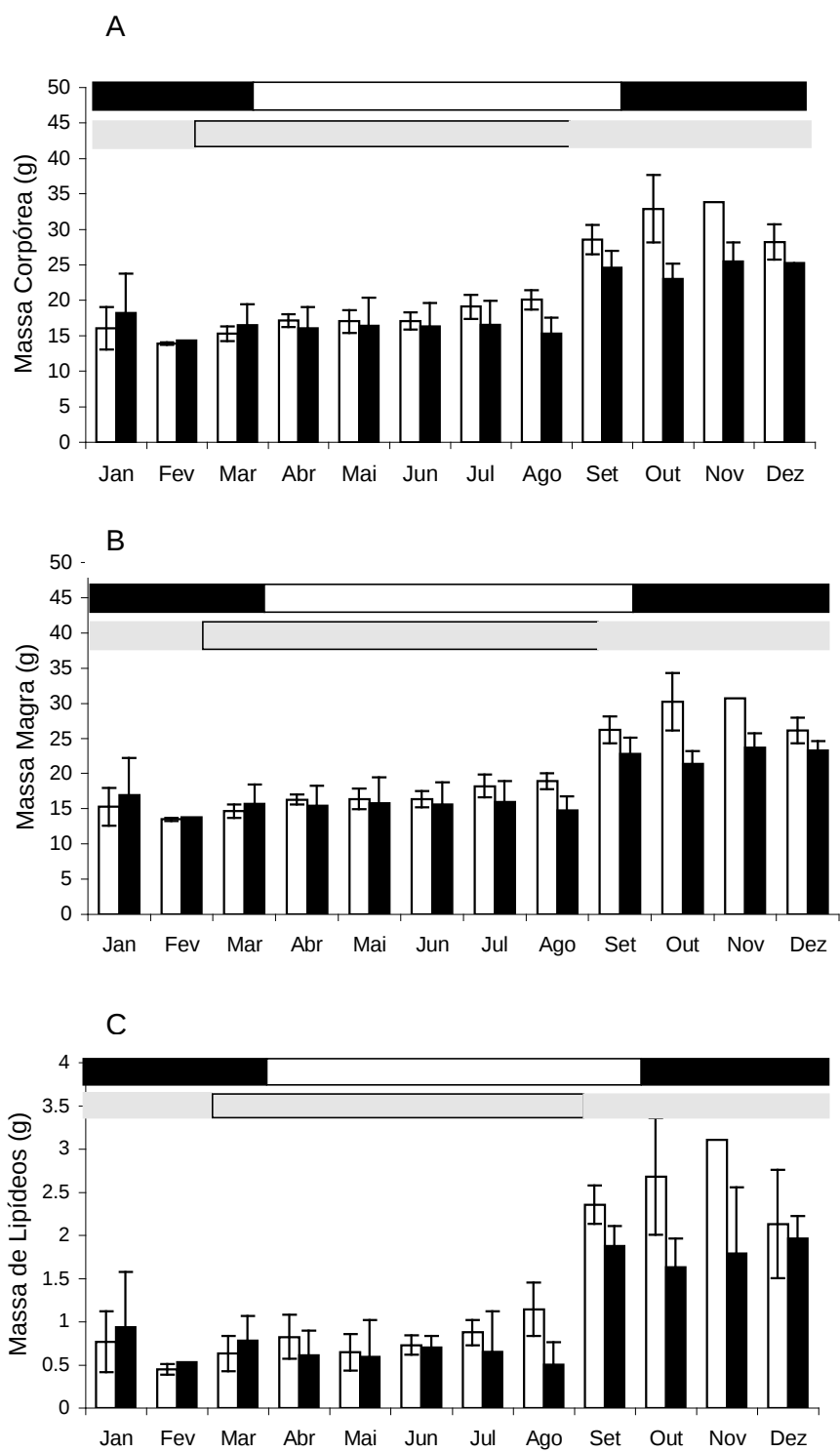
Figura 2.

Figura 3.



CAPITULO 3

**Variabilidade da Taxa Metabólica de *Gracilinanus microtarsus*
(Didelphimorphia: Didelphidae): efeito da Dieta e da Condição Corpórea.**

RESUMO

A variação da taxa metabólica em marsupiais tem sido principalmente associada à massa corpórea. Quando essa variável é controlada há uma variação residual que pode estar associada a outros fatores dentre eles à dieta. Esta hipótese foi testada analisando-se os efeitos da condição corpórea, período reprodutivo e dieta sobre a Taxa Metabólica em Repouso (TMR) de *Gracilinanus microtarsus*. Obtivemos uma equação alométrica para espécie entre a massa magra (MM) e TMR independente do estado reprodutivo do animal. O resultado dessa relação indicou que cerca de 45% da variabilidade da TMR pode ser explicada por diferenças na MM. O Modelo Geral Linear (MGL) mostrou que além da MM a condição reprodutiva também explica a variabilidade da TMR. Em uma análise exploratória sobre o hábito alimentar da espécie constatamos que a 82% da dieta é basicamente proveniente de invertebrados e apenas 18% de frutas. Não conseguimos detectar uma relação entre dieta e os resíduos da TMR. As possíveis causas para estes resultados foram discutidas e sugeridas como sendo outros fatores que poderiam responder pela variabilidade residual na TMR de *G. microtarsus*.

Palavras-Chave : Taxa metabólica em Repouso, condição corpórea, marsupial, *Gracilinanus microtarsus*, dieta, isótopos

ABSTRACT

Variation of the metabolic rate in marsupials has been mainly associated to differences in body mass. When this variable is controlled for, a residual variation which can be associated to the other factors among them the diet. This hypothesis was tested by analyzing the effects of body condition, reproduction and diet on the Resting Metabolic Rate (RMR) of the *Gracilinanus microtarsus*. We obtained an allometric equation for species between lean mass (MM) and RMR, independent of the reproductive state of the animal. The result indicates that 45% of the variation can be explained by differences in MM. The General model linear (GLM) showed that beyond MM, the reproductive condition also explains the variability of TMR. An exploratory analysis, on the alimentary habit of the species verified that 80% of the diet is basically originating from invertebrate and only 17% of fruits. We didn't get to detect a relationship between diet and the residual of TMR. The possible causes for these results were discussed and other factors that could be causing the residual variability in TMR of *G. microtarsus* were suggested.

. Key words : Basal metabolic rate, body condition, marsupial, *Gracilinanus microtarsus*, diet, isotope

1. Introdução

Em mamíferos a taxa de dispêndio de energia é um importante parâmetro associado à história de vida deste grupo (HARVEY, *et al.*, 1991). A taxa metabólica basal (TMB), parâmetro energético mais bem quantificado para organismos endotérmicos (TIELEMAN AND WILLIAMS, 2000; McNAB, 2002; WHITE AND SEYMOUR, 2003), é definido como sendo a taxa mínima de energia necessária para manter a homeostase, dentro da zona de neutralidade térmica, de um indivíduo adulto e não reprodutivo, em condições normotérmicas, em um estado pós-absortivo e durante seu período de inatividade (McNAB, 1997, 2002). Apesar de existirem algumas controvérsias acerca da abrangência desta definição (e.g. CRUZ-NETO *et al.*, 2003, CRUZ-NETO AND BOZINOVIC, 2004), a TMB vem sendo utilizada para prever ou ser correlacionada com diversos processos biológicos intimamente relacionados com os padrões de história de vida (e.g. KOZLOWSKI AND WEINER, 1997; McNAB, 2002; LOVEGROVE, 2003).

Uma das críticas que se faz aos critérios para se definir TMB, é que raramente tais condições se dêem simultaneamente (CRUZ-NETO *et al.*, 2003). Alguns animais são praticamente impossíveis de se medir em repouso ou em condições pós-absortivas (e.g. SPEAKMAN, 2000; McNAB, 2002). Por outro lado em algumas pequenas aves e morcegos, o estado pós-absortivo pode implicar um decréscimo da temperatura o corpo e em consequência uma mudança na TMB (e.g. MORRIS *et al.*, 1994; LOPEZ-CALLEJA AND FERNÁNDEZ, 2003). Em outro extremo os grandes ruminantes produzem calor

como produto da fermentação digestiva, o qual em influência direta na TMB (McNAB, 2002). Desta forma, esses animais se encontram em condições de metabolismo mínimo, por definição não se ajustam aos requisitos da TMR. Nestas situações sugere-se adotar o protocolo proposto por THOMPSON (1992), o qual utiliza o termo taxa metabólica em repouso (TMR), para medidas feitas sobre condições que violem um ou mais dos critérios usados para se definir TMB (SPEAKMAN *et al.*, 2003, 2004). Em razão desses determinantes utilizamos o termo TMR, pois apresentamos dados de animais reprodutivos, violando assim umas das premissas acima.

A taxa metabólica basal de uma espécie pode ser determinada por fatores como massa corpórea, estado nutricional, hábito alimentar, nível de estresse e temperatura ambiental (PORTER AND BRAND, 1993; ROLFE AND BROWN, 1997; McNAB, 2002; 2005). No entanto a massa corpórea é tida como sendo o principal fator determinante da TMB em mamíferos (SYMONDS AND ELGAR, 2002; WITHE AND SEYMOUR, 2003; MUÑOZ-GARCIA AND WILLIAMS, 2005).

Em mamíferos, a variabilidade da TMB é explicada principalmente por diferenças na massa e temperatura corpórea que respondem por cerca de 90% desta variação (McNAB, 2002). Entretanto, quando os efeitos desses fatores, são controlados, ainda observa-se uma variação residual (LOVEGROVE, 2000; TILEMAN & WILLIAMS, 2000; WHITE & SEYMOUR, 2003), que vem sendo discutida basicamente por duas hipóteses. A primeira atribui a variabilidade residual na TMB a fatores filogenéticos (e.g. HAYSSEN AND LACY, 1985; ELGAR AND HARVEY, 1987; BENNETT AND HARVEY, 1988), ao passo que a segunda a associa a fatores ecológicos, principalmente a dieta e fatores climáticos, independentes da filogenia (McNAB, 2002, 2005; LOVEGROVE, 2003; THOMPSON, 1992).

Especificamente, em nosso estudo, o significado funcional seria determinado cotejando a variabilidade na TMR com um aspecto específico da história de vida, a dieta de um pequeno marsupial. A influência da dieta sobre a TMR depende da maneira como os animais lidam com as flutuações na qualidade e disponibilidade de alimento, e potencialmente, estaria

correlacionada com os demais aspectos da história de vida, como por exemplo, condição corpórea. Em marsupiais a variabilidade na TMB está principalmente relacionada à massa corpórea tendo como o hábito alimentar um dos fatores responsáveis pela variação residual da TMB (McNAB, 1980a, 1980b, 1983, 1986a, 2002, 2005).

Em um contexto interespecífica, a categorização da dieta é uma das maiores críticas que se faz a respeito do efeito da dieta sobre a TMB. As razões são basicamente duas, não refletem de forma acurada o que os animais realmente comem e, mormente em análises filogenéticas, a categorização simples se confunde com a filogenia sendo impossível separar os efeitos (MUÑOZ-GARCIA AND WILLIAMS, 2005). Por outro lado a nível intraespecífico, a hipótese do hábito alimentar já foi testada, através da manipulação da qualidade da dieta (BOZINOVIC AND NOVOA, 1997; McCLISTER *et al.*, 2004). Todavia em nosso estudo utilizamos um “desenho natural”: os animais estavam soltos podendo se alimentar do que queriam. Utilizando-se do modelo de diluição isotópica (BEN-DAVID, 1997), é possível mensurar o índice participativo das fontes alimentares (dieta) a partir da análise de uma amostra do sangue de animais que receberam dietas de ingredientes vegetais (fonte 1) e de animais hipoteticamente alimentadas com uma dieta de origem animal (fonte 2). Dessa forma, é possível medir o quanto de cada item alimentar o animal assimila e testar quais os possíveis efeitos sobre o requerimento energético da espécie.

Poucos dos estudos mencionados acima que relacionam dieta e padrões metabólicos quantificaram os possíveis efeitos da dinâmica das reservas energéticas sobre esta relação. Portanto a possibilidade de que ao menos uma parte da diferença observada nestes estudos tenham sido ocasionadas pela dinâmica da condição corpórea, ainda é uma questão em aberto. Pelo exposto nos capítulos anteriores, modificações em função de sazonalidade ambiental da dieta poderiam induzir modificações na condição corpórea, e desta forma, a análise dos efeitos desta variável sobre a TMR mediará o objetivo do capítulo.

Neste capítulo pretendemos verificar a variabilidade da TMR em função de variações na condição corpórea e na dieta de *G. microtarsus*. A associação da

massa corpórea e dieta com TMR podem revelar as causas envolvidas na magnitude e variabilidade da TMR, desta forma, uma análise sobre o significado funcional da condição corpórea requer identificar os prováveis efeitos destas variações sobre o orçamento energético da espécie sob condições naturais.

2. Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido em um fragmento de cerradão de 307 ha localizado no município de Américo Brasiliense, (21°43'33"S, 48°01'07"W) entre janeiro e dezembro de 2004. A fisionomia de Cerrado do fragmento "cerradão" apresenta uma vegetação fechada do tipo floresta (GOODLAND, 1971; SILVA AND BATES, 2002), apresentando dossel predominantemente contínuo e cobertura arbórea que pode oscilar de 50% a 90%. A altura média do estrato arbóreo varia de 8 a 15 metros, proporcionando condições de luminosidade que favorecem a formação de estratos arbustivo e herbáceo diferenciados (RIBEIRO AND WALTER, 1998).

O clima da região foi classificado por TOLENTINO (1967) e PRIMAVESI *et al.* (1999) como sendo tropical de altitude, com duas estações bem definidas, a estação seca - fria que ocorre entre os meses de abril a setembro, e a estação úmida - quente que ocorre entre os meses de outubro a março. Para maiores informações sobre a área de estudo e metodologia utilizada na captura dos animais ver item 2.1 do Capítulo 2.

2.1. Obtenção de dados de taxa metabólica

Inicialmente realizamos experimentos em campo para determinar a zona de neutralidade térmica e encontramos que 26,7° C representa o ponto de quebra (*break-point*) na relação entre consumo de oxigênio em ml O₂/h e temperatura ambiente (Ta) para indivíduos em normotermia e que, portanto, esta temperatura corresponde ao limite crítico inferior (BRIANI *et al.*, dados não

publicados). Assim, utilizamos temperatura ambiente de 27 °C para obtenção dos dados de TMR no campo.

Um termopar foi colocado dentro dos respirômetros para checar a temperatura interna. Uma bomba suga e envia o ar fresco através de tubos contendo ascarite e sílica gel para completa remoção de CO₂ e H₂O, respectivamente. Este ar é direcionado para um equipamento (“manifold” - Sable Systems) que divide o fluxo em diferentes correntes que, posteriormente, são enviadas aos respirômetros. Um destes respirômetros não continha nenhum animal e servia como controle para calibração do analisador de O₂ durante as leituras. O ar que sai dos respirômetros é então enviado a um segundo equipamento (Sable Systems Multiplexer), onde válvulas solenóides selecionavam qual dos fluxos seria direcionado ao analisador de O₂ (Sable Systems FC-1). O fluxo de cada respirômetro é periodicamente averiguado com um fluxímetro manual (Cole-Palmer), que nos experimento variou entre 500 e 550 ml/min. Entre o “multiplexer” e o analisador de O₂, um controlador de fluxo de massa (Sierra Model) assegura que uma sub-amostra deste fluxo (200ml/min) seja enviada, após remoção de CO₂ e H₂O, para o analisador de O₂. Um computador com uma interface de 16bits e conversor A/D, (controlado por um programa de aquisição de dados (DATCAN V – Sable Systems) regula a temperatura da estufa, ativando um pequeno aquecedor quando necessário), seleciona qual fluxo de ar deve ser quantificado, controla o fluxímetro de massa, faz a leitura e armazena os dados do analisador de O₂ e do termopar para posterior análise.

Como a capacidade máxima da estufa é de 4 respirômetros, fizemos 2 experimentos por dia, 3 indivíduos por vez, mais o controle. Os dados de VO₂ foram obtidos para 3 animais simultaneamente, com o auxílio do aparelho multiplexer. O período de cada leitura foi um total de 65 min, sendo 15 min para cada animal, e 10 min para o controle. Ao todo foram 4 leituras, somando 4 h e 20 min. para cada experimento. Este procedimento na obtenção dos dados de VO₂, permitiu que as leituras dos 3 animais fossem feitas simultaneamente num dado intervalo de tempo, é importante para reduzir um viés muito comum nestes tipo de experimento (HAYES *et al.*, 1992). Sabe-se que medidas de VO₂

tomadas durante períodos muito curtos podem resultar numa alta variância aleatória dos valores obtidos e que, períodos muito longos podem levar a inclusão de período de atividade (MERLOO *et al.*, 1997). O procedimento aqui adotado, permitiu a obtenção dos registros de VO_2 em sub-amostragens, associado ao fato de não variar o período em que os animais eram medidos (sempre por 15 min. ininterruptos), tende a minimizar este problema (HAYES *et al.*, 1992).

Dentre as 4 leituras de VO_2 realizadas, sempre descartamos a primeira delas, procurando-se evitar a inclusão de medidas em que os animais pudessem apresentar sinais de atividade. A taxa metabólica foi calculada com base nas equações de WITHERS (1977), inicialmente expressa em $ml\ O_2/h$ e transformada em Kcal/dia, foi determinada com base na média das 3 leituras restantes.

Para cada animal tomamos o peso antes e após o experimento e usamos a média para as análises de VO_2 . Logo em seguida a cada experimento medimos a temperatura corpórea do animal por meio de um termopar introduzido no anus.

2.2. Determinação da condição corpórea

A condição corpórea da espécie foi quantificada e determinada de acordo com o modelo proposto no Capítulo 1. Para maiores esclarecimentos sobre os procedimentos adotados e a dinâmica da Condição Corpórea de *Gracilinanus microtarsus* ver Capítulos 1 e 2 respectivamente.

2.3. Análise Isotópica do sangue

Após os procedimentos de obtenção de dados de VO_2 e condição corpórea, todos os animais levados para o laboratório, tiveram uma amostra de sangue coletado via sino-orbital, com auxílio de um capilar heparinizado. Após a coleta, o sangue era transferido do capilar para um ependorph e as amostras secas em estufa a uma temperatura de 40°C. Mensalmente foram coletadas 10 amostras de sangue, sendo cinco de fêmeas e cinco de machos com exceção dos meses de setembro (N=8, 3 fêmeas e 5 machos), outubro (N=8, 4 fêmeas

e 4 machos) e novembro (N=6, 5 fêmeas e 1 macho). Essas amostras de sangue foram encaminhadas ao Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da UNESP – campus de Botucatu.

Juntamente com o sangue enviamos amostras mensais de invertebrados e frutas, possíveis itens participativos da dieta dos animais no campo. Esse material foi coletado, triado e seco em estufa a 40°C (ver Capítulo 2). No laboratório as amostras eram moídas e armazenadas em ependorph. Posteriormente, uma quantidade de 0,4 g de cada ordem de invertebrado e de cada família de fruta eram pesadas e misturadas como sendo o valor mensal da composição isotópica dos itens disponíveis para os animais no campo.

Posteriormente todas as amostras foram moídas em moinho criogênico de nitrogênio líquido (Spex 6700-230 freezer/mill – Spex Industries, Edison, Estados Unidos) à -196°C. Neste moinho, cada amostra foi colocada em um tubo diferente, para que não houvesse contaminação, moída por três minutos em frequência máxima, para obter material homogêneo de finíssima granulometria, com aspecto microscópico (LICATTI, 1997; DUCATTI *et al.*, 2002).

Uma quantidade de aproximadamente 0,35 mg de sangue foi utilizada para a medida das razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. As amostras foram pesadas dentro de cápsulas de estanho e, posteriormente, introduzidas por meio de amostrador automático no analisador elemental (EA 1108 – CHN – Fisons Instruments, Rodano, Itália) no qual, em presença de oxigênio (O_2) e óxido de cobre (CuO) a amostra foi queimada quantitativamente para a obtenção de CO_2 e NO_x ; este último foi então reduzido a N_2 na presença de cobre. Os gases formados foram separados em coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massas de razões isotópicas (Delta S – Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Os valores das razões isotópicas são expressos em delta per mil (‰) relativos aos padrões internacionais *PeeDee Belemnite* (PDB) para o ^{13}C e, nitrogênio do ar atmosférico para ^{15}N , de acordo com a seguinte equação geral:

$$\delta\text{‰}_{\text{(amostra, padrão)}} = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}] \times 1000 \quad (1)$$

onde R representa a razão entre o isótopo menos abundante e o mais abundante, em particular $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Cada amostra foi analisada duas vezes para a obtenção dos valores médios; as medidas foram repetidas quando o desvio padrão foi maior que 0,2‰ para $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ e 0,3‰ para $\delta\text{‰}^{15}\text{N}$.

Para determinar o percentual estimado de participação dos itens da dieta (Invertebrados e Frutos) na composição do sangue de *G. microtarsus*, foi empregado o modelo de diluição isotópica, de várias fontes na formação de um produto, apresentado por BEN-DAVID (1997) e deduzido e adaptado por DUCATTI *et al.* (2002), os quais, utilizam dos valores combinados de $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ e $\delta\text{‰}^{15}\text{N}$ das fontes e do produto gerado. Esse modelo permite mensurar o índice participativo de cada fonte a partir da análise de uma amostra do sangue de animais que receberam dietas de ingredientes vegetais (fonte 1) e de animais hipoteticamente alimentadas com uma dieta de origem animal (fonte 2).

Na natureza *G. microtarsus* alimenta-se de ingredientes de origem vegetal (Frutos) constituiu a fonte vegetal (fonte 1), e de origem animal (Invertebrados), constituiu a fonte animal (fonte 2). Os valores isotópicos de $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ e $\delta\text{‰}^{15}\text{N}$ foram determinados para a fonte 1 e fonte 2. Os animais capturados no campo, forneceram amostras de sangue (produto), para as análises isotópicas.

O índice participativo de qualquer fonte (X_n) pode ser estimado pela expressão (2);

$$X_n = \frac{d_n^{-1}}{d_1^{-1} + d_2^{-1}}; \quad (2)$$

Na expressão (2), (d_1) é a distância euclidiana entre a fonte 1 e o produto, (d_2) é a distância euclidiana entre a fonte 2 e o produto. A distância (d) calculada, representa o valor em per mil (‰) e é obtida pela expressão (3):

$$d = \sqrt{[d\text{‰}^{13}\text{C}(\text{Fonte}) - d\text{‰}^{13}\text{C}(\text{Produto})]^2 + [d\text{‰}^{15}\text{N}(\text{Fonte}) - d\text{‰}^{15}\text{N}(\text{Produto})]^2} \quad (3)$$

Uma vez calculado o valor da distância euclidiana (d), utiliza-se do seu valor inverso ($1/d$) na estimativa do índice participativo, em percentual (X), da fonte de origem animal ou vegetal no sangue dos animais.

2.4 Manuseio e Análise dos Dados

2.4.1 Descrição da Dieta

Inicialmente analisamos possíveis diferenças na assimilação de invertebrados e frutas através da composição isotópica do sangue dos animais através do test-t para amostras dependentes. Em seguida, utilizamos uma Análise de Variância de Dois Fatores (Two Way, ANOVA) para determinar possíveis diferenças entre variáveis categóricas como sexo e condição reprodutiva. Depois de comprovada a diferença entre tais variáveis utilizamos um teste a posteriori de Tukey, para detectar com maior precisão os pares que apresentam diferenças significativas entre si.

Posteriormente elaboramos um modelo geral linear (MGL), onde a variável resposta era a dieta, as variáveis preditoras categóricas eram o sexo e a condição reprodutiva e as variáveis preditoras contínuas eram a massa magra (MM) e a massa de lipídeos (ML). Apesar de termos coletados 118 indivíduos ao longo do ano (não contando as recapturas), estes modelos foram gerados com os animais que tinham a TMR e a condição corpórea calculada ($n=85$).

2.4.2 Padrões Metabólicos

Com o objetivo de determinar o efeito da condição corpórea sobre a variabilidade da TMR nós realizamos regressões lineares múltiplas, onde tínhamos como variável resposta a Taxa de Metabolismo em Repouso (TMR) de indivíduos reprodutivos e não reprodutivos e como variáveis preditoras contínuas a Massa Magra (MM) e Massa de Lipídeos (ML). Em seguida realizamos regressões do tipo (Backward Stepwise Regression), onde o primeiro modelo era composto por ambas variáveis independentes (MM e ML).

Em seguida, para determinar os padrões metabólicos foi necessário obter uma equação alométrica que descrevesse a relação entre a MM e a TMR

de *G. microtarsus*. Para tal, os valores de MM e TMR foram logaritimizados (base 10) com o propósito de linearizar a relação entre os parâmetros. Realizamos uma regressão linear entre as duas variáveis, cuja significância foi verificada através do valor do teste *F*. Todos os dados de TMR foram transformados em taxas absolutas antes da análise (PACKARD AND BOARDMAN, 1987).

Como parte da análise, os dados foram categorizados quanto ao sexo e a condição reprodutiva. Esse procedimento foi necessário para que pudéssemos checar possíveis diferenças nas inclinações das retas da regressão produzida para as diferentes categorias acima. Para isso utilizamos uma análise de ANCOVA (ZAR, 1999). Essa análise nos permitiu decidir por utilizarmos apenas uma equação alométrica independente do sexo e da condição reprodutiva dos animais.

O próximo passo foi verificar se a TMR da espécie estava sujeita as influências de fatores extrínsecos e intrínsecos. Para isso, geramos modelos, onde a variável resposta era o gasto energético (Taxa de metabolismo em Repouso = TMR), as variáveis preditoras categóricas eram o sexo e a condição reprodutiva e as variáveis preditoras contínuas eram: Modelo 1 (massa magra (MM) e massa de lipídeos (ML) e a o consumo de frutas); Modelo 2 (massa magra (MM), massa de lipídeos (ML) e o consumo de invertebrados). Estes dois primeiros modelos foram analisados sem a correção dos valores de TMR pela MM.

Em seguida, geramos dois novos modelos com a TMR corrigida pela MM, tomando como ponto de referência à equação alométrica determinada para espécie, através da seguinte equação: $\log_{10} \text{TMR} / (\log_{10} \text{MM}^{0,86})$. Teoricamente esse modelo controla o efeito da MM e permite que os efeitos de outras variáveis sejam detectados. Em nosso caso os modelos foram gerados com o propósito de detectarmos possíveis efeitos da dieta sobre a variabilidade da TMR.

Dessa forma os modelos (MGL), tiveram como variável resposta o gasto energético corrigido (Taxa de metabolismo em Repouso = TMR_c), as variáveis

preditoras categóricas foram sexo e condição reprodutiva e as variáveis preditoras contínuas foram consumo de invertebrados ou consumo de frutas.

Todos os modelos foram gerados seguindo a metodologia sugerida por GETZ *et al.* (2005) e já descrita anteriormente no capítulo 2. Assim como no capítulo anterior, todas as análises estatísticas seguiram SOKAL AND ROHLF (1995) e foram feitas utilizando os módulos Modelos Gerais Lineares e Modelos Gerais de Regressão do pacote estatístico STATISTICA 6.0 (STAT-SOFT, 2000). Os resultados são apresentados como médias $\pm$ 1 desvio padrão, e utilizamos um nível de 0,05 para acessar a significância dos testes utilizados.

3. Resultados

3.1 Análise da Composição Isotópica do Sangue e fatores que influenciam na Dieta

A aplicação do Modelo de Diluição Isotópica foi eficiente na obtenção dos resultados que avaliaram a dieta de *G. microtarsus*. A contribuição isotópica de invertebrados foi em média maior que a contribuição isotópica de frutos (81,91% e 18,09%) respectivamente ($t = -51,40$; $gl = 84$; $P < 0,05$) (Figura 1). Isso indica que a assimilação de nutrientes é basicamente proveniente de uma dieta a base de invertebrados, entretanto os resultados mostraram que a assimilação de nutrientes proveniente do consumo de frutos também é representativa (Figura 1).

O resultado da análise de variância mostrou que não há diferença significativa na assimilação de itens alimentares entre machos e fêmeas ($F=2$; $gl=80$; $P=0,187$), entretanto houve diferença significativa entre indivíduos reprodutivos e não reprodutivos ($F=5$; $gl=80$; $P=0,006$), ou seja, animais reprodutivos assimilam mais nutrientes de uma dieta a base de invertebrados do que de frutas. A interação entre sexo e condição reprodutiva não apresentou diferença significativa ($F=1$; $gl=80$; $P=0,482$). O teste a posteriori de Tukey, mostrou que a dieta de machos reprodutivos diferiu das fêmeas não reprodutivas ($gl=81$, $p=0,006$; $gl=81$, $P=0,005$) e também de machos não

reprodutivos (gl=81, $P=0,0109$; gl=81, $P=0,0110$). No entanto machos reprodutivos não diferiram de fêmeas reprodutivas (gl=81, $P=0,3616$).

Posteriormente a análise resultante do MGL reforçou os resultados da análise de variância de dois fatores. O modelo foi significativo ($r^2=0,43$; $F=4,6$; $P=0,002$). A composição isotópica do sangue variou apenas em função da condição reprodutiva (a assimilação de nutrientes derivados de invertebrados é maior em indivíduos reprodutivos do que em indivíduos não reprodutivos ($F=11,52$; $P<0,001$)).

3.2 Variabilidade da Taxa Metabólica

O resultado da análise de regressão múltipla mostrou que o modelo envolvendo as duas variáveis preditoras (MM e ML) foi significativo ($r^2=0,31$; $F=6,98$; $P=0,003$), mostrando que a TMR pode ser predita através de uma combinação entre as variáveis independentes. Seguindo então o procedimento estabelecido, analisamos os resultados da regressão (Backward Stepwise Regression). Os modelos resultantes propostos por essa análise foram significativos e consideraram apenas a variável MM como importante para prever a variabilidade da TMR (indivíduos reprodutivos: $F=12,54$; $P=0,01$) e (indivíduos não reprodutivos: $F=7,08$; $P=0,01$).

A relação entre taxa metabólica de repouso (TMR) e massa magra (MM) de *Gracilinanus microtarsus* utilizada neste estudo pode ser descrita pela seguinte equação alométrica:

$$TMR = -0,0617 \pm 0,133 + (0,863 \pm 0,106 * \log_{10} MM), (r^2=0,45; F=66,45; P<0,001;$$

Figura 2), onde, TMR = taxa metabólica em repouso (kcal/dia) e $\log_{10}MM$ = Logaritmo da massa magra na base 10 (gramas).

Esta equação alométrica geral independente do sexo e da condição reprodutiva foi possível após os resultados da análise de ANCOVA que mostrou não haver diferença significativa entre as inclinações das retas produzidas pela regressão ($F=0,54$; $P=0,656$), permitindo assim o uso de uma única equação alométrica para a espécie.

Os resultados gerados pelos modelos (MGL), mostraram que a variabilidade da TMR é em um primeiro momento afetada pela MM e pela

condição reprodutiva (Tabela 1). O modelo foi significativo e explicou 48% da variação na TMR ($F = 14,25$; $df = 79$; $r^2 = 0,48$; $P < 0,0001$). Após controlarmos o efeito da MM, o modelo resultante não foi significativo ($F = 0,99$; $df = 81$; $r^2 = 0,035$; $P = 0,40$) e nenhuma das variáveis predizem a variabilidade da TMR (Tabelas 2), mostrando não haver efeito da dieta sobre a TMR.

4. Discussão

4.1 Dieta

Gracilinanus microtarsus possui hábito alimentar insetívoro-onívoro, alimentando-se principalmente de invertebrados (MARTINS AND BONATO, 2004), além de frutos e pequenos vertebrados. No presente estudo o resultado da análise isotópica não foi diferente, corroborando com a hipótese de uma dieta insetívora – onívora da espécie (JULIEN-LAFERRIÈRE AND ATRAMENTOWCZ, 1990), mostrando claramente que a maior parte do alimento assimilado provém de uma dieta a base de invertebrados (Figura 1). Nesse tipo de análise, como os itens são consumidos pelos animais, a “impressão digital isotópica” destas fontes é refletida em seus tecidos, no caso o sangue, após um determinado tempo de metabolismo (DeNIRO AND EPSTEIN, 1978; GANNES *et al.*, 1998).

Como vimos nos resultados à composição isotópica do sangue variou apenas em função da condição reprodutiva. O fato do aumento do consumo de fontes ricas em proteínas (insetos) durante a reprodução, se dá pelo fato desse evento ser energeticamente dispendioso em marsupiais (HARDER *et al.*, 1996, KROCKENBERGER, 2003) e/ou pelo simples fato da atividade reprodutiva ser durante a estação chuvosa, onde a disponibilidade de recursos como invertebrados aumenta consideravelmente (FLEMING, 1973; O’CONNELL, 1979, QUENTAL *et al.*, 2001).

O padrão de consumo de frutos encontrado para a espécie em questão corrobora com a hipótese de que marsupiais são frugívoros oportunistas (JULIEN-LAFERRIÈRE AND ATRAMENTOWCZ, 1990). Embora este item seja esporadicamente consumido por marsupiais, para *G. microtarsus* pode ser

considerado como um importante recurso, representando em média cerca de 18% da fonte total de alimento.

Apesar de se mostrar eficiente à metodologia isotópica aplicada, não deve substituir as técnicas convencionais onde informações alimentares detalhadas são necessárias e principalmente quando várias opções de itens para consumo estão disponíveis (HOBSON AND CLARK, 1992). Entretanto, existem vantagens importantes para o uso de isótopos estáveis, que ocorrem naturalmente como indicadores alimentares, sobre as técnicas convencionais, dentre as quais, as estimativas dietéticas isotópicas são baseadas nos alimentos assimilados e não apenas nos alimentos ingeridos e, comparativamente podem ser obtidas informações de dietas consumidas a longos períodos (HOBSON AND CLARCK, 1992).

4.2 Variabilidade da Taxa Metabólica

Em mamíferos, a massa corpórea é o fator que melhor explica a variação da taxa metabólica (McNAB, 1988; 2002, 2005). Entretanto, quando os efeitos da massa corpórea são controlados, a variabilidade pode chegar a 300% sugerindo a influência de outros componentes. Entre eles estariam o componente histórico – filogenético – (HAYSSEN AND LACY, 1985; ELGAR AND HARVEY, 1987; CRUZ-NETO *et al.*, 2001), fatores ecológicos (dieta, clima, habitat) (McNAB, 2002 ; THOMPSON, 1992), bem como variações no tamanho dos órgãos (KONARZEWSKI AND DIAMOND, 1995, BURNESSE *et al.*, 1998). Em marsupiais, grande parte da variação (98,5%) da taxa metabólica esta correlacionada com a massa corpórea (McNAB, 2005). No entanto, variações intraindividuais da massa corpórea de uma espécie não são constantes ao longo do tempo apresentando variações diárias e sazonais (e.g. SPEAKMAN, 1996). Portanto, constatações da relação alométrica entre taxa metabólica e massa corpórea em um contexto intraespecífico pode ser pouco visível, o que sugere que a variabilidade na taxa metabólica não pode ser simplesmente explicada como sendo uma consequência da variação na massa total de um organismo (KOZLOWSKI AND WEINER 1997).

A associação da condição corpórea e dieta com a taxa metabólica podem revelar as causas envolvidas na magnitude de tal variabilidade. De acordo com o exposto acima a MM (componente da condição corpórea) e a condição reprodutiva da espécie (Tabela 1) foram em uma primeira análise, responsáveis pela variação da TMR, ou seja, *G. microtarsus* apresenta maiores demandas energéticas durante o período reprodutivo, o que coincide com os maiores valores registrados não só de MM, mas também da MC e da ML (Capítulo 2).

O período reprodutivo é um evento que demanda alto custo energético, exercendo influências na taxa metabólica (MORRISON AND McNAB, 1962; BOONSTRA *et al.*, 2001; FLEMING *et al.*, 1981, VELOSO, 2001). Indivíduos em diferentes estágios reprodutivos tendem a apresentar diferenças significativas na alocação de energia. Estudos sobre energética reprodutiva sugerem que para a maioria, senão para todos os grupos de mamíferos, a lactação exige maior gasto energético do que a gestação (*e.g.* THOMPSON, 1992).

Dados da literatura mostram que para a maioria dos mamíferos, quanto mais baixa a TMB maior é a TMR durante a reprodução (THOMPSON, 1992). Entre roedores, foi observado um aumento de 159% da TMR durante a gestação em relação à TMB, enquanto para as lactantes a TMR foi 200% superior à TMB (ANTINUCHI AND BUSH, 2001). Entre os marsupiais, que apresentam curta gestação e longo período de lactação, os baixos valores de TMB (MORRISON AND McNAB, 1962), também conferem diferenças entre TMR durante a lactação e TMB, sendo que os valores de TMR durante a lactação também são superiores aos da TMB (THOMPSON AND NICOLL, 1986), o que pode representar até 92% do aumento nos custos metabólicos durante o período reprodutivo (FLEMING *et al.*, 1981). Nossos resultados, assim como para outros mamíferos, mostram que a demanda energética durante o período reprodutivo, supera aquela dos períodos não reprodutivos (GITTLEMAN AND THOMPSON, 1988, VELOSO, 2001) (Tabela 1).

Durante este período de maior demanda energética tem-se um aumento na ingestão de alimentos, associados a uma maior disponibilidade de recursos

no ambiente (Capítulo 2), sejam nos períodos que antecedam a reprodução (GITTLEMAN AND THOMPSON, 1988; SPEAKMAN AND McQUEENIE, 1996; DEGEN *et al.*, 2002), ou durante o período reprodutivo (RANDOLPH *et al.*, 1977; SPEAKMAN AND McQUEENIE, 1996). O alimento ingerido em excesso pode ser transformado em reserva de gordura (RANDOLPH *et al.*, 1977; THOMPSON *et al.*, 1992, GITTLEMAN AND THOMPSON, 1988), mas também pode provocar aumento da massa de órgãos internos que por sua vez aumentam a eficiência de órgãos associados ao processamento de energia, como fígado e rins (HAMMOND *et al.*, 1994). A plasticidade e a maior produção metabólica dos tecidos e órgãos internos que compõem a MM em contraste a gordura podem ser, em partes responsáveis pela variabilidade da MM que por sua vez reflete na variação da TMR durante a reprodução (e.g. PIERSMA AND LINDSTRÖM, 1997; SCOTT AND EVANS, 1992, VELOSO, 2001). Variações na MM que podem ter efeito na alocação de energia e conseqüentemente na TMR ocorre também em função do alto requerimento de minerais no período reprodutivo durante a fase de lactação (REYNOLDS AND KUNZ, 2000 e referências),

Quanto à relação da dieta e TMR, tem-se sugerido que a variação residual da taxa metabólica em marsupiais esta fortemente relacionada com o hábito alimentar (McNAB, 2002; LOVEGROVE, 2003; THOMPSON, 1992). Todavia, não conseguimos detectar tal relação no presente estudo (Tabela 2). McNAB (1986a) sugere que altas taxas de metabolismo estariam associadas a dietas facilmente digeríveis, livres de agentes químicos e/ou disponíveis ao longo do ano, como por exemplo, dietas à base e frutas e/ou néctar. O padrão inverso também é esperado para animais que possuem uma dieta insetívora (McNAB, 1986b). Entretanto, esse padrão é questionável para *G. microtarsus*, pois a espécie não se adequa a um tipo particular de dieta, uma vez que apresenta hábito alimentar insetívora/onívora, e que oportunamente consome frutos (ELGAR AND HARVEY, 1987; JULIEN-LAFERRIÈRE AND ATRAMENTOWCZ, 1990).

Em resumo, os resultados obtidos mostraram que mesmo com refinamento da dieta através do modelo isotópico, o hábito alimentar não

responde pela variação da TMR de *G. microtarsus*. Um dos aspectos que McNAB (2005), ressalta e sugere em sua revisão enfocando a uniformidade da taxa metabólica basal em 71 espécies de marsupiais, é que outros fatores como uso do hábitat, clima, latitude, altitude e estratégia reprodutiva podem ser responsáveis pela variabilidade residual da TMB em marsupiais. Sendo assim, nossa hipótese da relação entre dieta e a variação residual da TMR, não se sustenta para *G. microtarsus*.

5. Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto pela orientação, ao amigo Paul François e a Luiza pelo auxílio na coleta dos dados no campo. A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho. O estudo teve suporte financeiro da FAPESP (proc. 00/09968-8) e bolsa de estudo do CNPq (proc. 140245/2003-0).

6. Literatura Citada

- ANTINUCHI, D. C. AND BUSH, C. 2001. Reproductive energetics and thermoregulatory status of nestlings in Pampas mice *Akodon azarae* (Rodentia: Sigmodontinae). *Physiological and Biochemical Zoology* 74(3): 319-324.
- BEN-DAVID, M., HANLEY, T. A., KLEIN, D. R. AND SCHELL, D. M. 1997. Seasonal diets of coastal and riverine mink: the role of spawning Pacific salmon. *Can. J. Zool.* 75: 803-811.
- BENNETT, P. M. AND HARVEY, P. H. 1988. Active and resting metabolism in birds: allometry, phylogeny and ecology. *J. Zool.* 213:327-363.
- BOONTRA, R. 2005. Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. *Journal of Zoology*. 86(2): 236-247.
- BOZINOVIC, F. AND NOVOA, F. F. 1997. Metabolic costs of rodents feeding on plant chemical defenses: a comparison between an herbivore and an omnivore. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A: 511-514.
- BURNES, G.P., YDENBERG, R.C. AND HOCHACHKA. 1998. Interindividual variability in body composition and resting oxygen consumption in breeding tree-swallows, *Tachycineta bicolor*. *Physiol. Zool.* 71: 247-256.
- CRUZ-NETO, A.P., GARLAND, T.JR. AND ABE, A.S. 2001. Diet, phylogeny, and basal metabolic rate in phyllostomid bats. *Zoology*, 104 (2001): 49-58.
- CRUZ-NETO, A. P. AND BOZINOVIC, F. 2004. The relationship between diet quality and basal metabolic rate in endotherms: insights from intraespecific analysis. *Physiological and biochemical zoology*. 77(6): 877-889.
- CRUZ-NETO, A. P., D. C. BRIANI AND F. BOZINOVIC. 2003. La tasa metabólica basal: ¿una variable unificadora en energética animal? En: *Fisiología Ecológica & Evolutiva: Teoría y Casos de Estudio*. (F. BOZINOVIC, EDITOR). Editora da Universidad Católica de Chile. Pp: 379-395.
- DEGEN, A. A., KHOKHLOVA, I. S., KAM, M. AND SNIDER, I. 2002. Energy requirements during reproduction in female common spiny mice (*Acomys cahirinus*). *J. Mamm.* 83(3): 645-651.

- DENIRO, M.J. AND EPSTEIN, S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 45: 341-351.
- DUCATTI, C., CARRIJO, A.S., PEZZATO, A.C. AND MANCERA, P.F.A. 2002. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Scientia Agrícola*, 59(1): 29-33.
- ELGAR, M.A., & HARVEY, P.H. 1987. Basal metabolic rates in mammals: allometry, phylogeny and ecology. *Functional Ecology*, 1: 25-36.
- FLEMING, T.H. 1973. The reproductive cycles of three species of opossums and other mammals in the Panama Canal zone. *Journal of Mammalogy* 54:439-455.
- FLEMING, M. W., HARDER, J. D. AND WUKIE, J. J. 1981. Reproductive energetics of the virginia opossum compared with some eutherians. *Comp. Bioch. Physiol.* 70B: 645-648.
- GANNES, L. Z., RIO, C. M. AND KOCH, P. 1998. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry Physiology*. 119A(3): 725-737.
- GETZ, L. L., OLI, M. K., HOFMAN, J. E., MCGUIRRE, B. AND OZGUL, A. 2005. Factor influencing movement distance of two species of sympatric voles. *Journal of Mammalogy*. 86(4):647-654.
- GITTLEMAN, J. AND THOMPSON, S. D. 1988. Energy Allocation in Mammalian Reproduction. *Amer. Zool.* 28: 863-875.
- GOODLAND, R. J. 1971. A physiognomic analysis of the "cerrado vegetation" of Central Brazil. *Journal of Ecology*, 59: 411-419.
- HAMMOND, K. A., KONARZEWSKI, M., TORRES, R. M. AND DIAMOND, J. 1994. Metabolic ceilings under a combination of peak energy demands. *Physiol. Zool.* 67(6): 1479 - 1506.

- HARDER, J. D.; HSU, M. J. & GARTON, D. W. 1996. Metabolic rates and body temperature of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) during gestation and lactation. *Physiological Zoology* 69:317-339
- HARVEY, P. H., PAGEL, M. D. AND REES, J. A. 1991. Mammalian metabolism and life-histories. *American Naturalist*. 137: 556-566.
- HAYES, J. P., SPEAKMAN, J. R. AND RACEY, P. A. 1992. Sampling bias in respirometry. *Physiol. Zool.* 65: 604-619.
- HAYSEN, V., AND LACY, R.C. 1995. Basal metabolic rate in mammals: taxonomic differences in the allometry of BMR and body mass. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81A: 741-754.
- HOBSON, K. A. AND CLARK, R. W. 1992. Assessing avian diets using stable-carbon and nitrogen isotopes. II. Factors influencing diet-tissue fractionation. *Condor*. 94: 189-197.
- JULIEN-LAFERRIÈRE, D. AND ATRAMENTOWICS, M. 1990. Feeding and Reproduction of three Didelphid Marsupials in two Neotropical Forests (French Guiana). *Biotropica* 22(4): 404-415.
- KONARZEWSKI, M. AND DIAMOND, J. 1995. Evolution of basal metabolic rate and organ masses in laboratory mice. *Evolution* 49(6): 1239-1248.
- KOZLOWSKI, J. AND WEINER, J. 1997 Interspecific allometries are by-products of body size optimization. *The American Naturalist*. 149:352-380.
- KROCKENBERGER, A. 2003. Meeting the energy demands of reproduction in females koalas, *Phascolarctos cinereus*: evidence for energetic compensation. *Journal of Comparative Physiology B* 173:531-540.
- LICATTI, F. 1997. Isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) em plantas do ciclo bioquímico C_3 e C_4 . Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 65p. Monografia.
- LÓPEZ-CALLEJA, M. V. AND FERNÁNDEZ, M. J. 2003. El tiempo y la regulación del presupuesto e energía: el caso de los picaflones. En: *Fisiología Ecológica & Evolutiva: Teoría y Casos de Estudio*. (F. BOZINOVIC, EDITOR). Editora da Universidad Católica de Chile.

- LOVEGROVE, B.G. 2000. The zoogeography of mammalian basal metabolic rate. *The American Naturalist*. 156: 201-219.
- LOVEGROVE, B.G. 2003. The influence of climate on the basal metabolic rate of small mammals: a slow-fast metabolic continuum. *J.comp Physiol B*. 173:87-112.
- MARTINS, E. G. and BONATO, V. 2004. On the diet of *Gracilinanus microtarsus* (Marsupialia, Didelphidae) in a Atlantic Rainforest fragment in southeastern Brazil. *Zeitschrift für Säugetierkunde (Mammalian Biology)*, 69: 58-60.
- MCLISTER, J. D., SORENSEN, J. S. AND DEARING, M. D. 2004. Effects of consumption of juniper on cost of thermoregulation in the woodrats *Neotoma albigula* and *Neotoma stephensi* at different acclimation temperatures. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77: 302-312.
- MCNAB, B. K. 1980a. Food habits, energetics, and the populations biology of mammals. *The American Naturalist*. (A). 116:106-124.
- MCNAB, B. K. 1980b. On estimating thermal conductance in endotherms. *Physiol. Zool.* (B). 53:145-156.
- MCNAB, B. K. 1983. Energetic, body size, and the limits to endothermy. *J. Zool. Lond.* 199:1-19.
- MCNAB, B. K. 1986a. Food habits, energetics, and the reproduction of marsupials. *J. Zool. Lond.* 208: 595-614.
- MCNAB, B. K. 1986b. On estimating thermal conductance in endothermy. *J. Zool. Lond.* 199: 1-19.
- MCNAB, B. K. 1988. Complications inherent in scaling the basal rate of metabolism in mammals. *Q. Rev. Biol.* 63:25-54.
- MCNAB, B. K. 1997. On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiol. Zool.* 70(6): 718-720.
- MCNAB, B. K. 2002. *The Physiological ecology of vertebrates: A view from energetics*. Cornell University Press, Ithaca.

- McNab, B. K. 2005. Uniformity in the basal metabolic rate of marsupials: its causes and consequences. *Revista Chilena de Historia Natural*. 78: 183-198.
- MEERLO, P. B., VISSER, L., MASMAN, G. H., DAAN, D. S. 1997. Basal Metabolic Rate in Relation do Body Composition and Daily Energy Expenditure in the Field Voe, *Microtus agrestis*. *Physiol. Zool.* 70(3): 362-369.
- MORRIS, S., CURTIN, A. L. AND THOMPSON, M. B. 1994. Heterothermy, torpor, respiratory gas exchange, water balance an the effect of feeding in Goul's long-eared bat *Nyctophilus gouldi*. *Journal of Experimental Biology*. 197309-335.
- MORRISON, P. AND McNAB, B. K. 1962. DAILY TORPOR IN A BRAZILIAN *MURINE OPOSSUM* (MARMOSA). *COMP. Bioch. Physiol.* 6: 57-68.
- MUÑOZ-GARCIA A. AND WILLIAMS, J. B. 2005. Basal Metabolic rate in Carnivores is associated with diet after controlling for phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*. 78(6):1039-1056.
- O'CONNELL, M. A. 1979. Ecology of didelphid marsupials from Northern Venezuela. In: *Vertebrate Ecology in the Northern Neotropics* (Eisenberg, J.F, ed.). Smithsonian Press, Washington, D.C.
- PACKAR, G. C., AND BOARMAN, T. J. 1987. The misuses of ratio to scale physiological ata that vary with body size. In: Feder, M. E. et al., (eds), *New Directions in Ecological Physiology*. Pp. 216-239.
- PIERSMA, T. AND LINDSTRÖM, A. 1997. Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptative behaviour. *Tree*. 12(4): 134-138.
- PORTER, R. K. AND BRAND, M. D. 1993. Body mass dependence of H^+ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate. *Nature*. 362: 628-630.
- PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C. P. A.; PEDROSO, A. F.; CAMARGO, A. C.; RASSINI, J. B.; ROCHA-FILHO, J.; OLIVEIRA, G. P.; CORREA, L. A.; ARMELIN, M. J. A.; VIEIRA, S. R.; DECHEN, S. C. F. 1999. Microbacia Hidrográfica do Ribeirão Canchim: um modelo real de Laboratório Ambiental. *Boletim de Pesquisa, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos*, 133 p.

- QUENTAL, T. B., FERNANDEZ, F. A. S., DIAS, A. T. C. AND ROCHA, F. S. 2001. Population dynamics of the marsupial *Micoureus demerarae* in small fragments of Atlantic Coastal Forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 17:339-352.
- RANDOLPH, P. A. 1977. Energy costs of reproduction in the *Sigmodon hispidus* cotton rat. *Ecology* 58: 31-45.
- REYNOLDS, D. S. AND KUNZ, T. H. 2000. CHANGES IN BODY COMPOSITION DURING REPRODUCTION AND POSTNATAL GROWTH IN THE LITTLE BROWN BAT, *MYOTIS LUCIFUGUS* (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE). 7(1): 10-17.
- RIBEIRO, J. F. AND WALTER, B. M. T. 1998. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: *Cerrado: Ambiente e Flora*. Sano, S. M. & Almeida, S. P. (eds.) Planaltina, DF. Embrapa. 556p.
- ROLFE, D. F. S. AND BROWN, G. C. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77: 731-757.
- SCOTT, I. AND EVANS, P. R. 1992. The metabolic output of avian (*Sturnus vulgaris*, *Calidris Alpina*) adipose tissue liver and skeletal muscle: implications for BMR /Body mass relationships. *Comp. Bioch. Physiol.* 103A(2): 329-332.
- SILVA, J. M. C. AND BATES, J. M. 2002. Biogeographic patterns and coservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience*, 52: 225-233.
- SOKAL, R. R. AND ROHLF, F. J. 1995. BIOMETRY: THE PRINCIPLES AND PRACTICE OF STATISTICS IN BIOLOGICAL RESEARCH. 3 ED. FREEMAN AND COMPANY. 850P.
- SPEAKMAN, J. R. 1996. Energetics and the evolution of body size in small terrestrial mammals. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 69: 63-81.
- SPEAKMAN, J. R. 2000. The cost of living: field metabolic rates of small mammals. *Adv. Ecol. Res.* v. 30: 178-297.

- SPEAKMAN, J. R. AND MCQUEENIE, J. 1996. Limits to sustained metabolic rate: The link between food intake, basal metabolic rate, and morphology in reproducing mice, *Mus musculus*. *Physiol. Zool.* 69(4): 746-769.
- SPEAKMAN, J. R., ERGON, T., CAVANAGH, K., REID, K., SCANTLEBURY, D. M. AND LAMBIN, X. 2003. Resting and daily energy expenditures of free-living field voles are positively correlated but reflect extrinsic rather than intrinsic effects. *Proc Natl Acad Sci.* 100:14057-14062.
- SPEAKMAN, J. R., KRÓL, E. AND JOHNSON, M. S. 2004. The functional significance of individual variation in basal metabolic rate. *Physiol Biochem Zool.* 77:900-915.
- SYMONDS, M. R. E. AND ELGAR, M. A. 2002. Phylogeny affects the estimation of metabolic scaling in mammals. *Evolution.* 56: 2330:2333.
- TIELEMAN, B. I. AND WILLIAMS, J. B. 2000. The adjustments of avian metabolic rates and water fluxes to desert environments. *Physiological and Biochemical Zoology.* 73:461-479.
- THOMPSON, S. D. AND NICOLL, M. E. 1986. Basal metabolic rate and energetics of reproduction in the therian mammals. *Nature* 321: 690-693.
- THOMPSON, S. D. 1992. Gestation and Lactation in small mammals: Basal Metabolic Rate and the Limits of Energy Use. In: T. E. TOMASI, T. H. HORTON (eds) *Mammalian Energetics*, Ithaca, N.Y., Cornell University Press.
- TOLENTINO, M. 1967. Estudo Crítico sobre o Clima da Região de São Carlos. Prefeitura Municipal de São Carlos, 78 p.
- VELOSO, C. 2001. Energética reproductiva de pequeños mamíferos. En: *Fisiología Ecológica & Evolutiva: Teoría y Casos de Estudio.* (F. BOZINOVIC, EDITOR). Editora da Universidad Católica de Chile. Pp:423-440.
- WHITE, C. R. AND SEYMOUR, R. S. 2003. Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass^{2/3}. *Proc. Natl Acad Sci.* 100:4046-4049.
- ZAR, J. H. 1999. *Bioestatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.

Tabela 1. Resultado final do Modelo Geral Linear mostrando os efeitos das variáveis preditoras categóricas (sexo e condição reprodutiva) e contínuas (massa magra, massa de lipídeos e contribuição isotópica de frutas e invertebrados na composição isotópica do sangue) sobre a variabilidade da taxa metabólica em repouso de *Gracilinanus microtarsus*. Os modelos foram significantes e explicaram 48% da variação na TMR ($F = 14,25$; $df = 79$; $r^2 = 0,48$; $P < 0,0001$). Ver texto para determinação das variáveis independentes e interações.

Variáveis	F	P
Sexo	0,7	0,40
Condição Reprodutiva	49,29	<0,0001
Massa Magra (MM)	17,73	<0,0001
Massa de Gordura (MG)	2,87	0,094
Contribuição Isotópica de Fruta (CIF)	0,66	0,420
Sexo	0,7	0,40
Condição Reprodutiva	49,30	<0,0001
Massa Magra (MM)	17,73	<0,0001
Massa de Gordura (MG)	2,87	0,094
Contribuição Isotópica de Invertebrados (CII)	0,67	0,414

Tabela 2. Resultado final do Modelo Geral Linear mostrando os efeitos das variáveis preditoras categóricas (sexo e condição reprodutiva) e contínuas (contribuição isotópica de frutas e invertebrados na composição isotópica do sangue) sobre a variabilidade da taxa metabólica em repouso de *Gracilinanus microtarsus*. Os modelos não foram significativos ($F = 0,99$; $df = 81$; $r^2 = 0,035$; $P = 0,40$). Ver texto para determinação das variáveis independentes e interações.

Variáveis	F	P
Sexo	0,182	0,671
Condição Reprodutiva	2,450	0,121
Contribuição Isotópica de Frutas (CIF)	0,354	0,553
Sexo	0,182	0,671
Condição Reprodutiva	2,450	0,121
Contribuição Isotópica de Invertebrados (CII)	0,366	0,547

Legenda das Figuras

Figura 1. Contribuição isotópica de invertebrados e frutas na composição isotópica do sangue de *Gracilinanus microtarsus*.

Figura 2. Relação entre o $\log_{10}$ da taxa metabólica em repouso (TMR – kcal/dia) e $\log_{10}$ da massa magra (gramas) para *Gracilinanus microtarsus*. Os círculos escuros representam os machos reprodutivos e os círculos vazios representam os machos não reprodutivos. Fêmeas reprodutivas e não reprodutivas estão representadas pelos triângulos escuros e claros respectivamente.

Figura 1

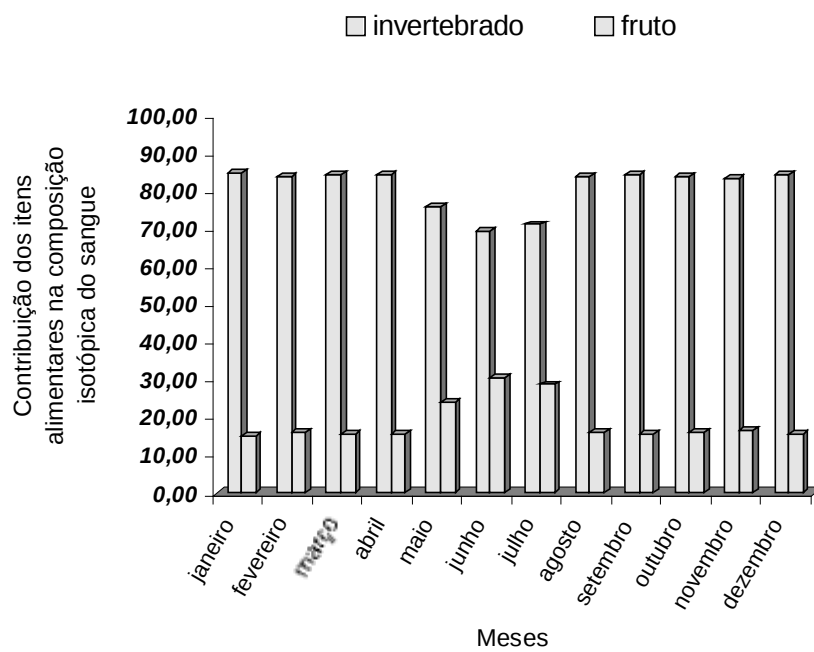
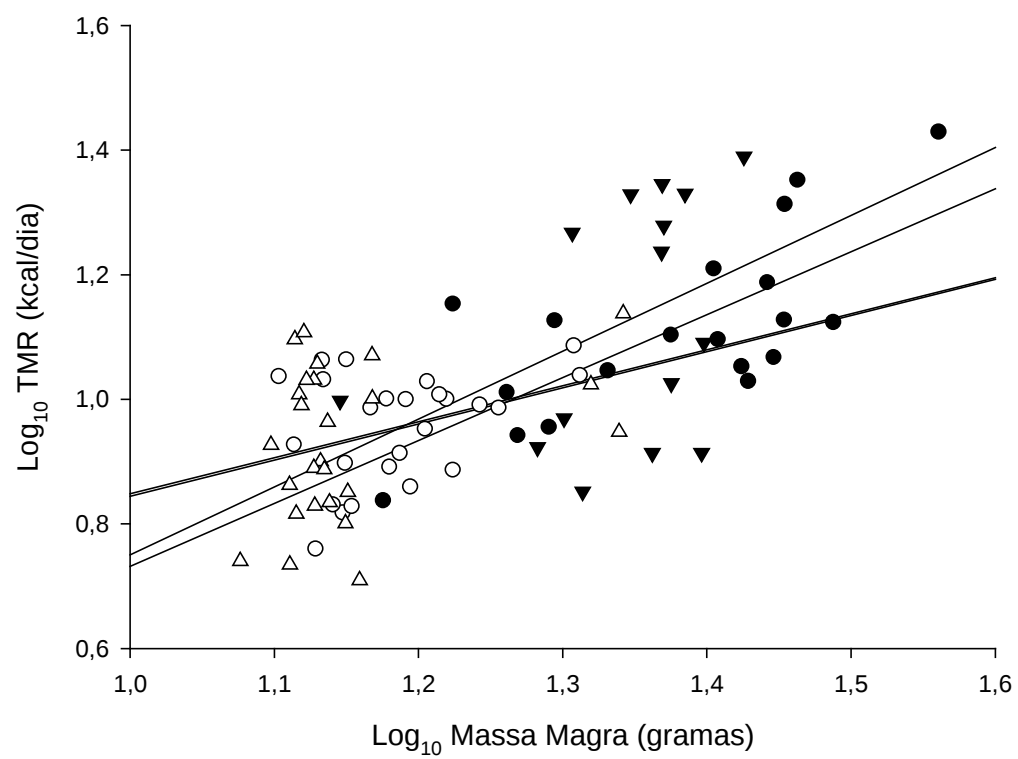


Figura 2



Conclusão Geral

Nas análises do capítulo 1 procuramos testar a acuracidade de vários modelos de regressão propostos para a validação de um método não-invasivo (TOBEC) para se estimar dois compartimentos da condição corpórea, (massa magra e massa e lipídeos) de *Gracilinaus microtarsus*. O método mostrou-se adequado para se estimar a massa magra. No entanto sua eficiência pode ser maior quando utilizado em conjunto com outras medidas biométricas para corrigir eventuais diferenças interindividuais na massa corpórea ou na massa magra. Portanto, não encontramos justificativa para o uso do chamado modelo clássico para estimar a massa magra com o método TOBEC.

Por outro lado, o método se mostrou aquém do desejado para se estimar a massa de lipídeos, independente do modelo utilizado (direto ou inverso). Portanto, a baixa capacidade do método não reflete qual o tipo de modelo é utilizado, mas sim as condições intrínsecas de reserva de gordura. Esta baixa eficiência também já foi observada em outros métodos onde os animais utilizados nas análises mostraram uma baixa variabilidade individual na quantidade de gordura. Este capítulo nos deu subsídios para que no capítulo 2 pudéssemos estudar a dinâmica de um dos principais fatores (condição corpórea) associados ao estado energético de um animal. A dinâmica da condição corpórea da espécie apresentou acentuadas variações sazonais. A espécie apresentou um aumento dos componentes da condição corpórea ajustados à estação úmida e ao período reprodutivo. Contudo, como discutido no capítulo 2, a variação da MC pode ser reflexo da variabilidade da condição corpórea associada a ajustes adaptativos das estratégias de vida e outras variáveis e interações entre fatores climáticos, alimentares, fisiológicos e também sociais. A existência de semelparidade também pode refletir tal variabilidade da condição corpórea. Sugiro que sejam realizados estudos específicos enfocando uma provável condição de semelparidade em marsupiais Neotropicais. Dessa forma poderíamos inferir com maior precisão, prováveis efeitos de estratégias evolutivas na condição corpórea dessas espécies associados ao estado energético.

Os dados obtidos no capítulo 3 sugerem que a MM juntamente com o estado reprodutivo dos animais são os fatores determinantes da variabilidade da TMR. Por outro lado quando os efeitos da MM foram controlados, não conseguimos detectar efeito de nenhuma outra variável utilizada nas análises. Embora se tenha sugerido que a variação residual da taxa metabólica basal em mamíferos esta relacionada com o hábito alimentar, nós não conseguimos detectar tal relação no presente estudo. Os padrões metabólicos associados a diferentes dietas como proposto por alguns autores é questionável para *G. microtarsus*, pois a espécie não se adequa a um tipo particular de dieta, uma vez que apresenta hábito alimentar insetívora/onívora, e que oportunamente consome frutos. Por fim em uma última revisão sobre TMB em marsupiais sugere-se que fatores como uso do hábitat, clima, latitude, altitude e estratégia reprodutiva podem ser responsáveis pela variabilidade residual da TMB em marsupiais.

De forma geral acredito ter alcançado o objetivo de nosso estudo no qual pretendíamos revelar as causas envolvidas na variabilidade da TMR. No entanto, sugiro que novos estudos sobre energética de marsupiais neotropicais sejam realizados, principalmente utilizando-se de metodologias padronizadas facilitando comparações interespecíficas cotejando ainda outros fatores como filogenia como determinante da magnitude das taxas metabólicas desses animais.