

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas
Bacharelado em Ciências Biológicas

Luciana da Silva

**Estimativas da herdabilidade do reconhecimento de parentesco e do
comportamento canibal em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera;
Nymphalidae)**

Porto Alegre

2013/1

Luciana da Silva

Estimativas da herdabilidade do reconhecimento de parentesco e do comportamento canibal em *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)

Trabalho de Conclusão do Curso de graduação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientadora: Janaína De Nardin

Porto Alegre

2013/1

AGRADECIMENTOS

Ao professor Aldo Mellender de Araújo pela amizade e orientação precisa, e pelo conhecimento que me transmitiu ao longo desse trabalho.

À Janaína De Nardin pela co-orientação essencial e ajuda com os experimentos, e pela atenção dedicada a mim em todos os momentos.

À minha irmã, Ana Carolina da Silva, pelo auxílio na montagem e acompanhamento dos testes, e pela companhia insubstituível e apoio do dia-a-dia.

Aos colegas do Laboratório de Genética Ecológica e Evolução de Lepidópteros pelo auxílio em campo, na criação das lagartas e borboletas e nas coletas de *Passiflora*.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

À minha família pelo apoio, carinho e compreensão dedicados a mim em todos os momentos ao longo dessa jornada.

Muito obrigada

RESUMO

O canibalismo é um comportamento comum em uma série de animais, tanto na natureza, quanto em condições de laboratório. Algumas espécies são capazes de reconhecer parentes, canibalizando preferencialmente indivíduos não aparentados, como ocorre nas lagartas da borboleta *Heliconius erato phyllis*. Este trabalho teve por objetivo realizar cruzamentos com diferentes coeficientes de endocruzamento ($F = 0$ e $F = 0,25$), entre adultos, cujas lagartas foram canibais e não-canibais, de *H. erato phyllis*, a fim de estimar a herdabilidade do reconhecimento de parentesco (não canibalismo) e do comportamento canibal, e de fazer inferências sobre o modo de herança desses fenótipos. Lagartas canibais e não-canibais foram criadas em laboratório até o estágio adulto e, a partir das quais, foram realizados exocruzamentos e endocruzamentos entre adultos que foram canibais (C), não-canibais (NC) e entre indivíduos que apresentaram comportamentos diferentes (C x NC e seu recíproco). A prole desses cruzamentos foi submetida a testes de canibalismo, realizados, cada um, com três ovos irmãos, e as frequências de indivíduos canibais e não-canibais foram estimadas. Além disso, foram calculadas as médias de indivíduos não-canibais nas proles, em cada tipo de cruzamento. Os resultados mostram que a média de filhos não canibais, e que, portanto, reconhecem parentes, é maior em endocruzamentos, independentemente do comportamento dos pais (na maioria acima de 60%). A frequência de indivíduos não canibais também foi mais alta em endocruzamentos, de uma forma geral. Entre os indivíduos não endocruzados foi observado um aumento de filhos canibais, mesmo quando um ou ambos os pais foram NC. Isso indica uma influência genética importante no comportamento não-canibal da prole, uma vez que devem existir genes para reconhecimento de parentes necessários em uma quantidade ideal para que ocorra o reconhecimento (efeito limiar). Por outro lado, o comportamento canibal pode ser influenciado pelo ambiente e também pela presença de poucos ou ausência de genes de reconhecimento. Os coeficientes calculados para herdabilidade do reconhecimento de parentesco (não canibalismo) e para o canibalismo mostraram consistência apenas no primeiro caso. Para $F = 0$, a h^2 do reconhecimento apresentou um valor próximo de 40%, enquanto que para $F = 0,25$, esse valor foi próximo de 80%. Diante do fato de que canibalismo e não canibalismo constituem sucessos de uma variável binomial, a estimativa de h^2 para o primeiro não tem sentido, pois teria os mesmos valores já apresentados para o reconhecimento. Esses resultados reforçam a existência de um forte componente genético na herança do reconhecimento de parentes e não para o canibalismo.

Palavras-chave: Canibalismo. Reconhecimento de parentesco. *Heliconius erato phyllis*. Herdabilidade. Endocruzamento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 MODELO DE ESTUDO: <i>Heliconius erato phyllis</i> (LEPIDOPTERA; NYMPHALIDAE).....	6
1.2 CANIBALISMO E RECONHECIMENTO DE PARENTESCO	6
1.3 INFERÊNCIAS SOBRE A HERANÇA DO RECONHECIMENTO DE PARENTESCO E HERDABILIDADE.....	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 CRIAÇÃO DAS FÊMEAS CAPTURADAS NA NATUREZA	12
3.2 TESTES DE CANIBALISMO, REALIZAÇÃO DE CRUZAMENTOS E CUIDADOS COM AS PROLES	12
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODELO DE ESTUDO: *Heliconius erato phyllis* (LEPIDOPTERA; NYMPHALIDAE)

A espécie *Heliconius erato phyllis* é uma borboleta tropical, pertencente à família Nymphalidae, encontrada em florestas de crescimento secundário, onde os adultos utilizam plantas do gênero *Passiflora* para ovopositar (Périco, 1999) e de cujas folhas as lagartas se alimentam. Essas borboletas são impalatáveis para seus predadores, permitindo uma vantagem seletiva maior em relação às borboletas palatáveis, pois menos indivíduos são predados e conseguem se reproduzir em maior número.

Indivíduos adultos de *Heliconius* formam dormitórios, onde se agregam, e são famosos por retornar a eles noite após noite (Mallet, 1986b). São borboletas que dispersam pouco, por curtas distâncias, pois após um breve período de dispersão, estabelecem-se em áreas onde permanecem pelo resto de suas vidas (Mallet, 1986a).

Fêmeas de *H. erato phyllis* colocam ovos individualmente, os quais, após a eclosão em lagartas, podem canibalizar ovos vizinhos (De Nardin e Araújo, 2011), irmãos ou não irmãos. É possível que um dos motivos para que as fêmeas coloquem seus ovos individualmente e, de preferência, em diferentes meristemas apicais de *Passiflora*, é justamente evitar que as lagartas recém-eclodidas canibalizem ovos que estão nas proximidades.

Por ser uma espécie de fácil adaptação às condições de insetário e cultivo de suas plantas hospedeiras (Kaminski *et al.*, 2002), é um organismo modelo de estudos em genética e evolução.

1.2 CANIBALISMO E RECONHECIMENTO DE PARENTESCO

O canibalismo, definido como predação intraespecífica, é uma característica comportamental encontrada em uma ampla variedade de animais, embora a maioria das referências a esse comportamento são superficiais ou baseadas em observações casuais em laboratório (Fox, 1975). O canibalismo consiste em um comportamento que apresenta custos e benefícios, podendo ser adaptativo por melhorar a taxa de crescimento, sobrevivência, vigor, longevidade e fecundidade (Richardson *et al.*, 2010).

Entretanto, também pode acarretar efeitos deletérios, como aquisição de parasitas nocivos ao organismo ou patógenos, e ferimentos causados pela presa. Os benefícios mais evidentes do canibalismo são satisfazer necessidades nutricionais e reduzir o potencial de competição intraespecífica (Schausberger e Croft, 2001). Predação intraespecífica é comum em muitos grupos de organismos (Fox, 1975), inclusive em insetos, onde a ocorrência de canibalismo em insetos não carnívoros, na sua maioria, encontra-se em espécies de coleópteros e lepidópteros (Richardson *et al.*, 2010). Estágios canibais e suas presas coespecíficas são, com frequência, grupos funcionais distintos que ocupam diferentes níveis tróficos na teia alimentar (Rudolf, 2007).

O comportamento canibal ocorre por vários motivos na natureza. Canibalismo por fins reprodutivos e sucesso da prole é um comportamento muito comum em alguns organismos, como insetos e aracnídeos. Muitos machos de aranhas servem de alimento para a fêmea durante ou imediatamente após a cópula, a fim de garantir a saúde e sobrevivência da prole. Uma das hipóteses para explicar esse comportamento, é que o canibalismo sexual pode ser uma estratégia de forrageamento adaptativo para aumentar a fecundidade de fêmeas, como observado no louva-a-deus *Pseudomantis albobimbrata*, cujas fêmeas ganham um benefício imediato de fecundidade, como um resultado direto do consumo do parceiro (Barry *et al.*, 2008). Um estudo realizado com a aranha *Argiope bruennichi*, mostrou que fêmeas canibais produzem proles com tempo de sobrevivência prolongado, comparadas às proles de fêmeas impedidas de canibalizar seus parceiros (Welke e Schneider, 2011).

Vertebrados com frequência ingerem óvulos subdesenvolvidos e proles natimortas. Cascavéis da espécie *Crotalus polystictus* alimentam-se da prole não-viável, sugerindo benefícios energéticos para recuperação de fêmeas parturientes (Mociño-Deloya *et al.*, 2009). Canibalismo é prevalente também em peixes teleósteos que apresentam cuidado parental. No peixe-bandeira, *Jordanella floridae*, é comum ocorrer canibalismo filial, caracterizado pelo consumo da própria prole (Klug e ST Mary, 2005).

Uma consequência do canibalismo é que canibais podem, ocasionalmente, ter que escolher entre comer um parente e um não parente (Pfennig, 1997), de forma que algumas espécies de organismos evitam canibalizar parentes.

O reconhecimento de parentesco é a habilidade de identificar ou distinguir parentes de não-parentes e acredita-se ser uma força motriz importante na evolução do comportamento social e sexual (Penn e Frommen, 2010). Tal reconhecimento pode ser

conceitualmente dividido em três etapas: 1) uma marca de reconhecimento é produzida, 2) um indivíduo percebe e interpreta essa marca e, conseqüentemente, 3) o mesmo age apropriadamente (Pfennig, 1997). Há duas razões principais para se esperar que os animais sejam capazes de distinguir entre parentes próximos geneticamente e não parentes ou parentes distantes: a primeira é para evitar endocruzamento e a segunda tem a ver com modelos de propagação de alelos altruístas pela seleção natural (Gadagkar, 1985). Dessa forma, essa capacidade de reconhecimento, com base genética, tem sido amplamente proposta como um mecanismo para facilitar o comportamento altruísta e evitar o endocruzamento (Paterson e Hurst, 2009).

O comportamento altruísta entre indivíduos relacionados biologicamente é explicado pela seleção de parentesco, um tipo de seleção que atua sobre indivíduos próximos geneticamente. Hamilton (1964a) criou um modelo matemático, conhecido como Regra de Hamilton, onde ele demonstrou que uma característica selecionada por parentesco pode aumentar sua frequência na população quando os custos para o altruísta são menores do que os benefícios para o receptor. Dessa forma, o comportamento altruísta entre parentes evolui quando a Regra de Hamilton, $rb > c$, é satisfeita, onde r é a relação de parentesco, b é o benefício para o receptor e c , o custo para o altruísta. Hamilton propôs também o conceito de *aptidão inclusiva*, que pode ser dividido em *aptidão direta*, resultante da reprodução pessoal do indivíduo, e *aptidão indireta*, que resulta na reprodução adicional de parentes. O comportamento que resulta em ganho de aptidão indireta, como o altruísta, é favorecido pela *seleção de parentesco* (Ridley, 2009).

Diversos organismos são capazes de reconhecer parentes, como aranhas (Beavis *et al.*, 2007; Morse, 2011), organismos marinhos coloniais (Grosberg e Quinn, 1986) e cupins da espécie *Microcerotermes arboreus*, que distinguem companheiros de ninho de outros coespecíficos através do odor (Adams, 1991). Em larvas da salamandra tigre, *Ambystoma tigrinum*, canibais discriminaram entre diferentes níveis de parentesco, até mesmo entre primos de primeiro grau e indivíduos não parentes, evitando canibalizar parentes (Pfennig *et al.*, 1994). Beavis *et al.* (2006), testaram aranhas da espécie *Delena cancerides* quanto ao canibalismo (com indivíduos parentes e não parentes) e, quando este comportamento ocorreu, apenas indivíduos não parentes foram canibalizados. Fêmeas do besouro *Tribolium confusum* preferem canibalizar ovos não relacionados a ovos parentes, demonstrando claro reconhecimento de parentesco (Parsons *et al.*, 2013). Esquilos da espécie *Spermophilus beldingi* produzem odores, em glândulas orais e

dorsais, que variam de acordo com o parentesco e servem como sinais de reconhecimento. Essas secreções podem ser usadas para discriminar entre várias classes de parentes desconhecidos (Mateo, 2003).

Em *Heliconius erato phyllis*, modelo de estudo desse trabalho, sabe-se que lagartas recém-eclodidas reconhecem irmãos biológicos, canibalizando preferencialmente ovos não parentes quando há escolha (De Nardin e Araújo, 2011).

Poucos estudos tratam da ocorrência de canibalismo em borboletas do gênero *Heliconius* e praticamente não existem trabalhos sobre o reconhecimento de parentescos nesses organismos, especialmente com enfoque genético.

1.3 INFERÊNCIAS SOBRE A HERANÇA DO RECONHECIMENTO DE PARENTESCO E HERDABILIDADE

A determinação genética do sexo nos diferentes organismos ocorre através de diferentes sistemas. Animais gonocóricos e plantas dióicas frequentemente exibem mecanismos de determinação do sexo com cromossomos sexuais heteromórficos, designados X e Y em sistemas onde o macho é heterogamético e Z e W, em sistemas onde o sexo heterogamético é a fêmea (Traut e Marec, 1997).

Nos lepidópteros, a determinação genética do sexo ocorre através de um sistema onde os machos são homogaméticos, ou seja, apresentam dois cromossomos sexuais iguais, caracterizados como ZZ. Já as fêmeas são heterogaméticas (Traut, 1999; Scriber e Evans, 1986) e apresentam dois cromossomos sexuais diferentes, um Z e outro W (ZW), diferentemente do que ocorre em mamíferos, por exemplo, onde o sexo heterogamético é o macho. Baseando-se nessa característica, um aumento de filhos não canibais em cruzamentos onde a mãe também fosse não canibal poderia indicar uma herança ligada ao sexo, onde os genes para reconhecimento de parentesco estariam ligados a um dos cromossomos sexuais.

Por outro lado, o reconhecimento de parentesco poderia ser uma herança quantitativa, com vários genes (poligenes), em diferentes locos nos autossomos, cuja determinação fenotípica depende de um limiar. Muitas características são expressas apenas quando atingem um valor limiar crítico (Mossey, 1999), onde um determinado número de genes é necessário para que o fenótipo se manifeste. Vários estudos mostram a existência de um efeito fenotípico com limiar em doenças humanas, como é

o caso de uma série de doenças mitocondriais (Carvalho e Ribeiro, 2002; Rossignol *et al.*, 2003), doença de Alzheimer (Pedersen *et al.*, 2001), fenda palatina e lábio leporino, hipertensão, esquizofrenia, entre outros (Mossey, 1999). Em insetos, alguns fenótipos também são determinados por um efeito de limiar. No grilo *Grillus firmus*, o dimorfismo em relação ao tamanho das asas (Roff, 1990) e a divisão de trabalho de higienização das colônias, em abelhas da espécie *Apis mellifera* (Oxley *et al.*, 2010), são exemplos de determinação fenotípica com limiar.

É possível que, em *H. erato phyllis*, o reconhecimento de parentesco ocorra através de um sistema similar, onde vários genes de pequeno efeito expressam o fenótipo não canibal.

Neste trabalho, indivíduos exocruzados e endocruzados foram comparados quanto às frequências de não canibalismo e canibalismo nas proles. Uma vez que o endocruzamento aumenta a frequência de homozigotos, espera-se que cruzamentos entre irmãos apresentem maior frequência de filhos não canibais, independentemente do comportamento dos pais. Além disso, foram estimados os valores de herdabilidade (h^2) para o canibalismo e, principalmente para o reconhecimento de parentes (não canibalismo), a fim de verificar a influência dos genes na expressão desses fenótipos. Em termos simples, a herdabilidade é uma medida de similaridade entre parentes. Mais especificamente, é a fração da variância genética na população, em relação à variância fenotípica total (Bull *et al.*, 1982).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto foi idealizado por não existirem trabalhos sobre a ocorrência de canibalismo e reconhecimento de parentesco nas borboletas do gênero *Heliconius*, principalmente com enfoque genético. Em *H. erato phyllis*, embora haja informações sobre a presença de canibalismo (Gilbert, 1975; Brown Jr. e Mielke, 1972), não existem estudos que tratem do reconhecimento de parentesco, com exceção de De Nardin e Araújo, 2011. Alguns cruzamentos e testes de canibalismo já foram realizados anteriormente por Janaína De Nardin durante seu mestrado. No entanto, houve a necessidade de aumentar o número amostral, repetindo tais cruzamentos, além de realizar outros tipos que ainda não haviam sido feitos, com o intuito de estimar a herdabilidade dos comportamentos canibal e não canibal, e fazer inferências sobre o modo de herança do reconhecimento de parentesco nessa espécie de borboleta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar cruzamentos entre indivíduos, cujas lagartas foram canibais (macho x fêmea) e entre não-canibais (idem) de *Heliconius erato phyllis*, bem como cruzamentos alternativos (macho canibal x fêmea não-canibal e seu recíproco). Tais cruzamentos serão realizados obedecendo-se ao critério de cruzar irmãos ($F = 0,25$) e não irmãos ($F = 0$).
2. Através desses cruzamentos, analisar as proles, verificando a ocorrência ou não de canibalismo, e estimar a herdabilidade (h^2) tanto do comportamento não-canibal quanto do canibal.
3. Fazer inferências quanto ao modo de herança do reconhecimento de parentesco, comparando indivíduos endocruzados com indivíduos não endocruzados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CRIAÇÃO DAS FÊMEAS CAPTURADAS NA NATUREZA

Fêmeas de *Heliconius erato phyllis* foram capturadas em populações naturais, nas localidades de Águas Belas (Viamão), Instituto de Pesquisas Hidráulicas – IPH (pertencente ao Campus do Vale – UFRGS) e em um terreno particular da rede Zaffari de supermercados (Porto Alegre). As fêmeas de campo foram criadas em viveiros de 2m x 2m x 3m, em área adjacente ao Departamento de Genética da UFRGS, no Campus do Vale (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). A composição vegetal dos viveiros simula o ambiente natural, com diversas espécies de plantas, inclusive *Passiflora suberosa*, *P. misera* e *P. capsularis*, nas quais essa espécie de borboleta ovoposita, e de cujas folhas as lagartas se alimentam. As fêmeas foram isoladas em viveiros individuais, alimentadas com uma mistura especial, composta por água, mel e pólen, e seus ovos coletados diariamente, com auxílio de um pincel.

3.2 TESTES DE CANIBALISMO, REALIZAÇÃO DE CRUZAMENTOS E CUIDADOS COM AS PROLES

Os testes para verificar o comportamento (canibal/não-canibal) iniciaram em fevereiro de 2012, os quais foram interrompidos no período de inverno (junho a agosto) e retomados em setembro do mesmo ano, sendo realizados até maio de 2013. Cada teste foi realizado com três ovos irmãos (isto é, provenientes da mesma fêmea) dispostos nos vértices de um triângulo equilátero de 0,5cm de lado, confeccionado com papel “dupla-face” de cor verde. Como as fêmeas dessa espécie são monândricas, há a certeza de que os ovos de uma mesma fêmea são irmãos completos (Drummond, 1984). Cada teste foi montado em uma placa de Petri, onde o triângulo era colocado no centro, sobre papel toalha para conservar a umidade, e mantido em temperatura ambiente.

A primeira lagarta a eclodir, de cada teste, teve seu comportamento acompanhado durante 45 minutos, tempo suficiente para que a mesma entrasse em contato com os ovos irmãos. Após esse período, a lagarta foi retirada da placa e transferida para um pote de plástico transparente, sobre um pedaço de papel toalha absorvente, identificada com um código C ou NC (Canibal ou Não-Canibal,

respectivamente) e um número. O mesmo procedimento foi feito com os ovos irmãos, considerados controles, que eram retirados do triângulo logo após o término do teste. As lagartas foram criadas no laboratório de Genética Ecológica e Evolução de Lepidópteros da UFRGS, em temperatura controlada (25°C) e alimentadas diariamente com *P. suberosa*, até o estágio adulto. Com os indivíduos adultos, então, realizaram-se endocruzamentos ($F = 0,25$): cruzamentos entre irmãos canibais, irmãos não-canibais e irmãos com comportamentos diferentes (C e NC), além de cruzamentos entre não parentes ($F = 0$), obedecendo aos critérios anteriores. As fêmeas fecundadas também foram mantidas isoladas em viveiros, com as mesmas características descritas acima, e seus ovos coletados diariamente. As proles obtidas com os cruzamentos foram submetidas a testes de canibalismo, como descrito anteriormente para seus pais.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para fins de análise, os dados deste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foram agrupados com dados obtidos por Janaína De Nardin, durante seu mestrado (De Nardin, 2012).

As frequências de lagartas canibais e não-canibais foram estimadas e, considerando o comportamento dos pais (mãe NC, mãe C, pai NC, pai C), foram calculadas as médias ponderadas de indivíduos não-canibais, visto que o tamanho das irmandades nos diversos cruzamentos variou bastante. Além disso, foi realizado um teste *t* unilateral para amostras independentes (Zar, 1996), para comparação entre as médias de não canibalismo de indivíduos exocruzados e endocruzados. Optou-se por fazer um teste unilateral, pois se presume que exista um efeito de limiar na expressão do reconhecimento de parentesco. Dessa forma, espera-se um aumento a partir do limiar nos cruzamentos entre irmãos, cuja frequência de NC seja maior do que em exocruzamentos. As estimativas de herdabilidade foram obtidas através das fórmulas adaptadas de Bull *et al.* (1982):

$$\hat{\sigma}_g^2 = \frac{S}{(f-1)} \times \frac{n}{(n-1)} \times \frac{p(1-p)}{(n-1)}$$

$$\hat{\rho}_B = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{p(1-p)}$$

onde σ_g^2 é um estimador da variância genética, S é a soma dos quadrados das frequências de não-canibais (p), f é o número de proles e n é a média do tamanho das irmandades; ρ_B é um estimador da herdabilidade, cujo valor deve ser corrigido por uma tabela especial (Bull *et al.*, 1982). Esses valores corrigidos pela tabela foram multiplicados por dois, pois as irmandades são formadas por irmãos completos. Como os fenótipos canibal e não-canibal são representados por uma variável binomial, não foi possível usar o método clássico da regressão linear.

Todo o processamento de dados foi realizado manualmente, com auxílio do *Software Excel* (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo inicial desse trabalho consistia em analisar os efeitos do endocruzamento em *H. erato phyllis*, além dos objetivos citados anteriormente. No entanto, essas análises foram adiadas e não incluídas no projeto desse Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), devido ao curto prazo para realização do mesmo. Apesar disso, os dados para tais análises foram obtidos durante o desenvolvimento dessa pesquisa e estão disponíveis para futuros testes estatísticos e redação de um artigo para publicação. Os efeitos do endocruzamento na ontogenia dos indivíduos serão analisados após o término do TCC, verificados através das seguintes variáveis: medidas de peso e volume de ovos, mortalidade durante o desenvolvimento larval, tempo de desenvolvimento do ovo ao adulto, peso de pupas e tamanho do adulto (medido através da área da asa anterior direita de cada indivíduo). Essas análises terão o objetivo de estimar a chamada “depressão pelo endocruzamento”.

Os testes de canibalismo iniciaram em fevereiro de 2012 e foram interrompidos nos meses de junho a agosto, período de inverno em que não é possível manter a criação de lepidópteros por causa das baixas temperaturas. Os experimentos foram retomados em setembro do mesmo ano e realizados até maio de 2013, durante o desenvolvimento do TCC.

No total foram realizados, aproximadamente, 530 testes, cada um com três ovos provenientes da mesma fêmea. Deste total, por volta de 170 testes foram invalidados por motivos diversos, como por exemplo: dúvidas quanto a marcas de canibalismo, ovos secos, eclosão de lagartas nos momentos em que não era possível acompanhar o comportamento (p.ex. durante a alta madrugada, durante aulas e outros compromissos), às vezes passando muito tempo até que as mesmas fossem retiradas dos testes, entre outros. O total de testes válidos foi, então, de aproximadamente 350 testes, todos os quais utilizados para realizar os objetivos estimados para esse trabalho.

Foi obtido um total de 20 cruzamentos, 13 deles entre indivíduos não aparentados e sete entre indivíduos irmãos (endocruzamentos) (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência de indivíduos canibais (C) e não-canibais (NC) nas proles obtidas durante esse Trabalho de Conclusão de Curso, resultantes de cruzamentos entre pais canibais, pais não-canibais e pais com comportamentos diferentes ($\text{♀C} \times \text{♂NC}$ e seu recíproco), conforme o grau de parentesco (F) e tamanho da irmandade (N).

Proles	F	N	Comportamento dos pais		Frequência dos fenótipos nas proles	
			♂	♀	C	NC
1	0	3	C	C	0,33	0,67
2	0	22	C	C	0,59	0,41
3	0	29	NC	NC	0,66	0,34
4	0	4	C	NC	0,5	0,5
5	0	34	C	NC	0,38	0,62
6	0	29	C	NC	0,59	0,41
7	0	13	C	NC	0,54	0,46
8	0	6	NC	C	0,33	0,67
9	0	4	NC	C	0	1
10	0	3	NC	C	0,33	0,67
11	0	29	NC	C	0,62	0,38
12	0	18	NC	C	0,78	0,22
13	0	31	NC	C	0,55	0,45
14	0,25	14	C	C	0,14	0,86
15	0,25	4	C	C	0,75	0,25
16	0,25	19	C	C	0,68	0,32
17	0,25	3	C	C	0,33	0,67
18	0,25	13	NC	NC	0,46	0,54
19	0,25	8	NC	NC	0,75	0,25
20	0,25	15	C	NC	0,33	0,67

Entre indivíduos não parentes, dois cruzamentos foram entre adultos provenientes de lagartas canibais, um entre não-canibais, quatro cruzamentos entre machos C e fêmeas NC, e seis entre machos NC e fêmeas C. Em relação aos endocruzamentos, quatro foram entre canibais, dois entre não-canibais e um entre macho canibal e fêmea não-canibal. Não foi possível obter resultados do endocruzamento recíproco, entre macho NC e fêmea C, embora o cruzamento tenha sido realizado, pois a fêmea morreu no viveiro, predada por algum animal desconhecido, visto que foram encontradas apenas as asas da mesma. Outros dois cruzamentos do mesmo tipo foram realizados, porém as fêmeas não colocaram ovos, possivelmente por causa das temperaturas baixas que predominaram nos últimos dias de experimento. Além disso, tentativas de endocruzar machos NC com fêmeas C foram realizadas anteriormente, mas não houve cópula.

Como mencionado anteriormente, aos dados desse TCC foram acrescentados os dados de De Nardin (2012). Dessa forma, obteve-se um total de 29 cruzamentos, 18 dos quais entre indivíduos não endocruzados e onze entre indivíduos irmãos (Tabela 2). Esse aumento no número amostral foi importante para dar maior confiabilidade aos resultados.

Tabela 2 – Frequência de indivíduos canibais e não-canibais no total de proles, resultantes de cruzamentos entre pais canibais, pais não-canibais e pais com comportamentos diferentes (♀C X ♂NC e seu recíproco), conforme o grau de parentesco (F) e tamanho da irmandade (N). (*)

Proles	F	N	Comportamento dos pais		Frequência dos fenótipos nas proles	
			♂	♀	C	NC
1	0	3	C	C	0,33	0,67
2	0	22	C	C	0,59	0,41
3	0	16	C	C	0,75	0,25
4	0	6	C	C	0,67	0,33
5	0	3	C	C	0,67	0,33
6	0	29	NC	NC	0,66	0,34
7	0	22	NC	NC	0,59	0,41
8	0	14	NC	NC	0,86	0,14
9	0	4	C	NC	0,5	0,5
10	0	34	C	NC	0,38	0,62
11	0	29	C	NC	0,59	0,41
12	0	13	C	NC	0,54	0,46
13	0	6	NC	C	0,33	0,67
14	0	4	NC	C	0	1
15	0	3	NC	C	0,33	0,67
16	0	29	NC	C	0,62	0,38
17	0	18	NC	C	0,78	0,22
18	0	31	NC	C	0,55	0,45
19	0,25	14	C	C	0,14	0,86
20	0,25	4	C	C	0,75	0,25
21	0,25	19	C	C	0,68	0,32
22	0,25	3	C	C	0,33	0,67
23	0,25	15	C	C	0,13	0,87
24	0,25	3	C	C	0	1
25	0,25	13	NC	NC	0,46	0,54
26	0,25	8	NC	NC	0,75	0,25
27	0,25	18	NC	NC	0,22	0,78
28	0,25	14	NC	NC	0,29	0,71
29	0,25	15	C	NC	0,33	0,67

* Dados desse TCC combinados com os de De Nardin (2012)

Observou-se que, de maneira geral, a ocorrência de canibalismo foi maior em cruzamentos entre não parentes ($F = 0$), onde 12 dos 18 cruzamentos apresentaram frequência de canibais acima de 50%. Por outro lado, a frequência de não canibalismo foi maior em proles de indivíduos endocruzados, onde a ocorrência de lagartas não-canibais foi maior que 50% em oito dos 11 cruzamentos.

Acredita-se que a característica herdada geneticamente é o reconhecimento de parentesco e, portanto, o comportamento não-canibal. Para verificar essa possibilidade, as análises desse trabalho foram preferencialmente relacionadas ao não canibalismo. Portanto, a partir da tabela 2 foi calculada a frequência geral de não canibalismo em toda a amostra, considerando $F = 0$ e $F = 0,25$, utilizando a média ponderada, visto que o tamanho das irmandades é diferente entre os cruzamentos. A frequência de NC para $F = 0$ foi de 0,42 e para $F = 0,25$ foi de 0,64. Tais resultados mostram claramente, já na primeira análise, um aumento considerável na frequência de não-canibais (em torno de 20% a mais) quando os indivíduos foram endocruzados, em relação aos cruzamentos entre não parentes.

Para uma segunda análise das frequências de não canibalismo entre as proles, as mesmas foram separadas de acordo com o comportamento isolado de cada pai. A justificativa para isso deve-se à hipótese de que poderia haver uma herança ligada ao sexo, do reconhecimento de parentesco e, portanto, do fenótipo não-canibal. Dessa forma, as proles foram separadas conforme a Tabela 3 e as frequências de NC foram estimadas.

Tabela 3: Frequência total de indivíduos não-canibais nas irmandades, de acordo com o comportamento dos pais, independentemente do tipo de cruzamento, para $F = 0$ e $F = 0,25$.

	Comportamento dos pais			
	♀		♂	
	C	NC	C	NC
$F = 0$	0,40	0,43	0,45	0,41
$F = 0,25$	0,64	0,63	0,65	0,49
Teste t unilateral	4,7809***	6,8259***	5,000***	1,9465 ^{n.s.}
gl	120	92	104	90

*** Significante para $\alpha = 0,001$

Observa-se que, independentemente do comportamento dos pais, houve um aumento na frequência de não-canibais nas proles endocruzadas, na sua maioria acima de 60%. Apenas quando os machos foram não-canibais, houve uma frequência similar entre exocruzados e endocruzados. Isso provavelmente ocorreu devido à ausência de proles de um endocruzamento ($\sigma^{\text{NC}} \times \text{♀C}$), o qual não foi possível obter, conforme já descrito anteriormente. É possível que com a realização desse endocruzamento, a frequência de NC nas proles endocruzadas aumente em relação às exocruzadas. Por outro lado, em cruzamentos entre indivíduos não aparentados, a frequência de NC foi baixa, em torno de 40%, tanto quando o pai ou a mãe foram canibais, quanto em cruzamentos onde os mesmos foram não-canibais.

Quando comparadas as médias de não canibalismo entre os dois valores de F (Tabela 3), através de um teste *t* unilateral, os resultados foram altamente significativos, com uma única exceção. O resultado que não apresentou significância ocorreu quando o pai foi NC, provavelmente devido ao endocruzamento ausente na amostra ($\sigma^{\text{NC}} \times \text{♀C}$). Observa-se, em apoio a esse argumento, que as frequências de não-canibais, quando $F = 0$, são uniformes, independentemente do pai ou a mãe serem canibais ou não-canibais.

Esses resultados mostram que, provavelmente, não há relação entre a frequência de não canibalismo e uma herança ligada ao sexo, visto a homogeneidade dos mesmos. Ou seja, a frequência varia de acordo com o coeficiente de endocruzamento e não com o comportamento dos pais (machos ou fêmeas).

Em borboletas da espécie *Papilio glaucus*, fêmeas melânicas geralmente produzem apenas filhas melânicas, enquanto que fêmeas amarelas produzem apenas filhas amarelas, pois acredita-se que as formas melânicas e amarelas são controladas por um loco no cromossomo W (Scriber e Evans, 1986). Dessa forma, se o reconhecimento de parentes fosse ligado ao cromossomo sexual materno, W, o comportamento da prole seria similar ao comportamento da mãe. No entanto, não houve diferença na proporção de filhos não-canibais, quando a mãe foi canibal ou não-canibal. O comportamento do pai também não apresentou influência no comportamento da prole, o que sugere ausência de uma herança ligada ao sexo. Turner e Sheppard (1975) sugeriram ausência de crossing-over em fêmeas de *Heliconius erato*. Sendo assim, se houvesse uma relação na proporção entre mães NC e filhos NC, indicando uma herança sexual materna do reconhecimento de parentes, a ausência de crossing-over poderia ser um reforço para essa teoria.

A sexagem das proles não foi realizada devido 1) à grande mortalidade de imaturos durante o desenvolvimento, principalmente em endocruzamentos; 2) por já ter sido realizada por De Nardin (2012), onde a razão sexual não diferiu de 1:1. Para melhor determinar esse tipo de herança, será importante futuramente determinar o sexo dos indivíduos nas proles dos cruzamentos. No entanto, se houver algo relacionado, provavelmente seja ligado ao cromossomo Z, presente em ambos os sexos.

Uma vez obtidos os cruzamentos e seus descendentes, foram testadas hipóteses monogênicas sobre a herança do reconhecimento, tanto para um loco com dois alelos, quanto para dois locos. As análises mostraram que essas hipóteses foram incompatíveis com os resultados obtidos.

Dessa forma, é mais provável que a herança do reconhecimento de parentesco seja uma herança quantitativa, com limiar. As estimativas de herdabilidade foram importantes para reforçar essa sugestão.

Foram estimados os coeficientes de herdabilidade para $F = 0$ e $F = 0,25$ tanto para o não canibalismo, quanto para o canibalismo. No entanto, os dados mostraram consistência apenas nos cálculos da h^2 do primeiro, conforme era esperado, cujos valores foram estimados entre 20% e 40% para $F = 0$, sendo mais próximo de 40% e entre 60% e 80% para $F = 0,25$, ficando mais próximo de 80%. Considerando que as lagartas foram criadas em ambiente de laboratório, com condições ambientais controladas e alimentação idêntica, a influência ambiental é a mesma em indivíduos canibais e não-canibais.

Se uma característica é herdável, então existem locos genéticos afetando a variação fenotípica, que apresentam um padrão de herança (Templeton, 2011). Dessa forma, o valor obtido para a h^2 do não canibalismo é alto, mostrando uma forte influência de genes associados ao reconhecimento de parentesco, reforçando que provavelmente existam genes que determinam esse fenótipo, juntamente com a influência ambiental.

Esse valor elevado na h^2 do não canibalismo, quando $F = 0,25$, é sustentado pela teoria genética que explica o aumento na incidência de fenótipos relacionados a genes em homozigose. Devido aos ancestrais em comum partilhados, os filhos têm uma chance maior de herdar genes iguais do pai e da mãe, que são cópias idênticas de um único gene ancestral (Templeton, 2011).

De Nardin e Araújo (2011) mostraram que, quando as lagartas têm a oportunidade de escolher entre ovos irmãos e não irmãos, o canibalismo de ovos não

parentes (66%) foi significativamente maior do que o canibalismo de ovos irmãos (34%). Entre indivíduos endocruzados e não endocruzados, conforme visto nesse trabalho, a frequência de não canibalismo nas proles é maior no primeiro caso. Portanto, as lagartas têm a capacidade de serem canibais, mas reconhecem e evitam canibalizar irmãos. Esses resultados reforçam a ideia de que os filhos de indivíduos endocruzados apresentam mais genes para reconhecimento em homozigose.

Os resultados obtidos ao longo desse trabalho sugerem, então, a presença de um componente genético em indivíduos que reconhecem irmãos, e indicam que o modo de herança do reconhecimento de parentesco é uma herança quantitativa com limiar. Na herança poligênica, uma característica é determinada pela interação de um número de genes em diferentes locos, cada um com pequeno efeito aditivo, aliados a fatores ambientais (Mossey, 1999).

Os dados sugerem a existência de um efeito de limiar em *H. erato phyllis*, sendo necessário que as lagartas apresentem um número determinado (ainda desconhecido) de genes para expressarem o fenótipo não-canibal. Por outro lado, mesmo que elas apresentem alguns genes de reconhecimento, se esses não estiverem em número suficiente para alcançar o limiar, não haverá o reconhecimento de parentesco e, por consequência, o fenótipo canibal poderá ser expresso.

Em relação ao canibalismo, as estimativas de herdabilidade não foram consideradas, uma vez que se trata de uma variável binomial, onde os valores de h^2 do canibalismo seriam iguais aos do não canibalismo. Considerando que p seja a frequência de não canibalismo em uma prole, $1-p$ é a frequência de canibalismo. A variância de uma variável binomial é $p(1-p)$, a qual é utilizada nas estimativas de herdabilidade, resultando em valores idênticos.

Resultados preliminares em De Nardin (2012) sugerem que a frequência de canibalismo é ambiente-dependente, isto é, alguns locais com baixa densidade de *Passiflora* mostram altas frequências de canibalismo. Estudos experimentais em andamento reforçam essa tendência (Rosana Huff, comunicação pessoal). No entanto, não se descarta a possibilidade de que também existam genes para o comportamento canibal. A fome é uma característica ambiental que pode aumentar as tendências canibais, mas não é essencial para iniciar tal comportamento, muitas vezes sendo uma resposta à redução na disponibilidade de fontes alternativas de alimento (Fox, 1975). Richter (1986), trabalhando com larvas de Noctuídeos, sugeriu que o canibalismo iniciado pela fome é influenciado por muitos genes que atuam em diferentes alvos,

como no desenvolvimento de gordura corporal e atividade enzimática, e que esse comportamento pode estar sob o controle de um único gene, com outros genes desempenhando um papel secundário.

5 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que o reconhecimento de parentesco é uma herança quantitativa, com um sistema de poligenes, onde possivelmente o fenótipo não-canibal dependa de um limiar de expressão. Esse fenótipo é mais frequente em endocruzamento, favorecendo um aumento na frequência de genes de reconhecimento em homozigose nas proles. A herdabilidade alta para o não canibalismo em endocruzamentos reforça essa sugestão. Por outro lado, o canibalismo é um comportamento influenciado pelo ambiente ou possivelmente pela ausência ou presença de poucos genes para o reconhecimento de parentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E.S. *Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite *Microcerotermes arboreus**. Proc Natl Acad Sci USA, v. 88, p. 2031-2034, 1991.
- BARRY, K. L.; HOLWELL, G. I.; HERBERSTEIN, M. E. *Female praying mantids use sexual cannibalism as a foraging strategy to increase fecundity*. Behavioral Ecology, p. 710-715, 2008.
- BEAVIS, A.S.; ROWELL, D.M.; EVANS, T. *Cannibalism and kin recognition in *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae), a social huntsman spider*. J Zool, v. 271, p. 233-237, 2007.
- BROWN, K. S. Jr; MIELKE, O. H. H. *The Heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and General Comments, with a Supplementary Revision of the Tribe*. Zoologica, v. 57, p. 1-40, 1972.
- BULL, J.J.; VOGT, R.C.; BULMER, M.G. *Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination*. Evolution, v. 36, n. 2, p. 333-341, 1982.
- CARVALHO, M. F. P.; RIBEIRO, F. A. Q. *As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial*. Rev Bras Otorrinolaringol, v. 68, n. 2, p. 268-275, 2002.
- DE NARDIN, J. *A evolução dos comportamentos canibal e não-canibal em imaturos de *Heliconius erato phyllis* e evidências da herança do reconhecimento de parentesco lagarta-ovo*. Porto Alegre, 2012. 116 p. Dissertação (Mestrado). Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DE NARDIN, J.; ARAÚJO, A.M. *Kin recognition in immatures of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)*. J Ethol, v. 29, p. 499–503, 2011.
- DRUMMOND, B. A. III. *Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera*. In: Smith, RL (ed). Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Academic, London, p. 291-370, 1984.
- FOX, L.R. *Cannibalism in natural populations*. Annu Rev Ecol Syst, v. 6; p. 87-106, 1975.

GADGKAR, R. *Kin recognition in social insects and others animals – A review of recent findings and a consideration of their relevance for the theory of kin selection.* Proc Indian Acad Sci (Anim Sci), v. 94, n. 6, p. 587-621, 1985.

GILBERT, L. E. *Ecological Consequences of a Coevolved Mutualism Between Butterflies and Plants.* In: Gilbert LE, Raven PH (eds). *Coevolution of Animal and Plants.* University of Texas Press, Austin, p. 210-240, 1975.

GROSBERG, R.K.; QUINN, J.F. *The genetic control and consequences of kin recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate.* Nature, v. 322; p. 456-459, 1986.

HAMILTON, W.D. *The Genetical Evolution of Social Behavior. I.* J theor Biol, v. 7, p. 1-16, 1964a.

KAMINSKI L.A. *et al. Morfologia externa dos imaturos de imaturos de heliconíneos neotropicais. III. Heliconius erato phyllis (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae).* Rev Bras Zool, v. 19, n. 4, p. 977-993, 2002.

KLUG, H.; ST MARY, C. M., *Reproductive fitness consequences of filial cannibalism in the flagfish, Jordanella floridae.* Animal Behaviour, v. 70, p. 685-691, 2005.

MALLET, J. *Dispersal and gene flow in a butterfly with home range behavior: Heliconius erato (Lepidoptera; Nymphalidae).* Oecologia (Berlin), v. 68, p. 210-217, 1986a.

MALLET, J. *Gregarious roosting and home range in Heliconius butterflies.* National Geographic Research, v. 2, n. 2, p. 198-215, 1986b.

MATEO, J. M., *Kin recognition in ground squirrels and other rodents.* J Mammal, v. 84, n. 4, p. 1163-1181, 2003.

MOCIÑO-DELOYA, E.; *et al. Cannibalism of nonviable offspring by postparturient Mexican lance-headed rattlesnake, Crotalus polystictus.* Animal Behaviour, v. 77, p. 145-150, 2009

MORSE, D.H. *Do cannibalism and kin recognition occur in just-emerged crab spiderling?* J Arachnol, v. 39, p. 53-38, 2011.

- MOSSEY, P. A. *The Heritability of Malocclusion: Part 1 – Genetics, Principles and Terminology*. Br J Orthod. v. 26, p. 103-113, 1999.
- OXLEY, P. R.; SPIVAK, M.; OLDROYD, B. P. *Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (Apis mellifera)*. Molecular Ecology, v. 19, p. 1459-1461, 2010.
- PARSONS, W.; ZHONG, W.; RUDOLF, V. H. W. *Mating status and kin recognition influence the strength of cannibalism*. Animal Behaviour, v. 85, p. 365-369, 2013.
- PATERSON, S.; HURST, J.L. *How effective is recognition of siblings on the basis of genotype?* J Evol Biol, v. 22, p. 1875-1881, 2009.
- PEDERSEN, N. L.; POSNER, S. F.; GATZ, M. *Multiple-Threshold Models for Genetic Influences on Age of Onset for Alzheimer Disease: Findings in Swedish Twins*. Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetics). v. 105, p. 724-728, 2001.
- PENN, D.J.; FROMMEN, J.G. *Kin recognition: an overview of conceptual issues, mechanisms and evolutionary theory*. In Kappeler P (ed.) Animal Behavior: Evolution and Mechanisms, p. 55-85, 2010.
- PÉRICO, E. *Estrutura populacional e dinâmica de três sub-populações de Heliconius erato phyllis (Lep.: Nymph.) no sul do Brasil*. Acta Scientiae, v. 1, n. 2, p. 9-16, 1999.
- PFENNIG, D.W. *Kinship and Cannibalism*. Bioscience, v. 47, n. 10, p. 667-675, 1997.
- PFENNIG, D.W.; SHERMAN, P.W.; COLLINS, J.P. *Kin recognition and cannibalism in polyphonic salamanders*. Behavioral Ecology, v. 5, n. 2, p. 225-232, 1994.
- RICHARDSON, M.L. *et al. Causes and Consequences of Cannibalism in Noncarnivorous Insects*. Annu Rev Entomol, v. 55, p. 39-53, 2010.
- RICHTER, P. *Inheritance of Cannibalism Behaviour in Noctuid Larvae: a Single Gene Hypothesis*. Biol Zentralbl, v. 105, p. 615-619, 1986.
- RIDLEY, M. *Evolução*. Cap. As unidades de Seleção. In. Mark Ridley. *Evolução*. Trad. Henrique Ferreira, Luciane Passaglia, Rivo Fischer. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 320-339.

- ROFF, D. A. *Selection for changes in the incidence of wing dimorphism in Grillus firmus*. Heredity, v. 65, p. 163-168, 1990.
- ROSSIGNOL, R. et al. *Mitochondrial threshold effects*. Biochem J, v. 360, p. 751-762, 2003.
- RUDOLF, V.H.W. *Consequences of stage-structured predators: cannibalism, behavioral effects, and trophic cascades*. Ecology, v. 88, n. 12, p. 2991-3003, 2007.
- SCHAUSBERGER P.; CROFT B.A., *Kin recognition and larval cannibalism by adults females in specialist predaceous mites*. Animal Behaviour, v. 61, p. 459-464, 2001.
- SCRIBER, J. M.; EVANS, M. H. *An exceptional case of paternal transmission of the dark form female trait in the tiger swallowtail butterfly, Papilio glaucus (Lepidoptera: Papilionidae)*. J Res Lepid, v. 25, n. 2, p. 110-120, 1986(87).
- TEMPLETON, A. R. *Genética de populações e Teoria Microevolutiva*. Cap. Sistemas de Acasalamento. Trad. Reinaldo Alves de Brito. Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética – SBG, 2011, p. 48-81.
- TRAUT, W. *The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths*. Eur J Entomol, v. 96, p. 227-235, 1999.
- TRAUT, W.; MAREC, F. *Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta)*. Chromosome Research, v. 5, p. 283-291, 1997.
- WELKE, K.W.; SCHNEIDER, J. M. *Sexual cannibalism benefits offspring survival*. Animal Behaviour, v. 83, p. 201-207, 2011.
- ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. Ch. Two-sample Hypotheses. Terceira Edição. New Jersey. Ed. Prentice-Hall do Brasil, Ltda., Rio de Janeiro, 1996, p. 123-161.