

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí  
Programa de Pós-Graduação em Conservação de  
Recursos Naturais do Cerrado

**BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS E  
MUTAGÊNICOS EM *Coturnix coturnix japonica*  
EXPOSTAS À ABAMECTINA**

**DENISE BRAGA GOMES DE FARIA**

**Orientador(a):** Profa. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues

**Coorientador(a):** Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Urutaí, fevereiro de 2018



## **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano**

*Reitor*

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

*Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

### **Campus Urutaí**

*Diretor Geral*

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

*Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

## **Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado**

*Coordenador*

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

**Urutaí (GO)  
2018**

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO  
CAMPUS URUTAÍ**

DENISE BRAGA GOMES DE FARIA

**BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS E MUTAGÊNICOS EM  
*Coturnix coturnix japonica* EXPOSTAS À ABAMECTINA**

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado  
(Mestrado Profissional)**

Urutaí (GO)  
2018

**DENISE BRAGA GOMES DE FARIA**

**BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS E MUTAGÊNICOS  
EM *Coturnix coturnix japonica* EXPOSTAS À ABAMECTINA**

*Orientadora*

Profa. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues

*Coorientador*

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –  
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais  
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí (GO)  
2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Câmpus Urutaí**

F224b Faria, Denise Braga Gomes de.

Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em *coturnix coturnix japonica* expostas à abamectina.

65 fls.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues

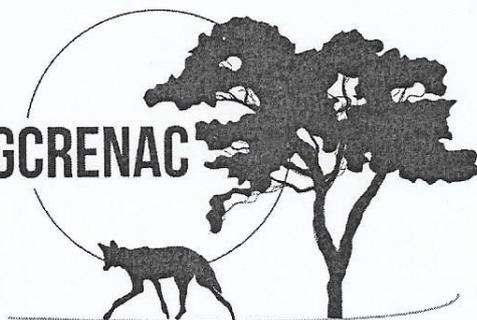
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Câmpus Urutaí, 2018.

1. *Aves*. 2. Comportamento animal. 3. Abamectina. 4. Poluição aquática. 5. Neurotoxicidade. 6. Resposta ao predador I. Título.

CDU 573

PPGCRENAC



Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

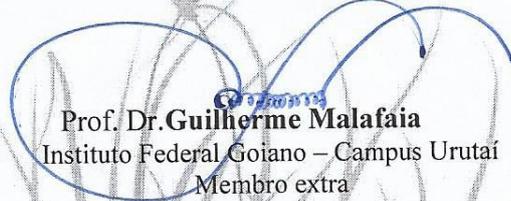
## FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

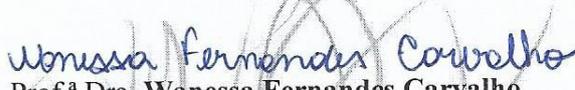
Título da dissertação:	<i>Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em <u>Coturnix coturnix japonica</u> expostas à abamectina</i>
Orientadora:	Prof.ª Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues
Coorientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Autora:	Denise Braga Gomes de Faria

Dissertação de Mestrado APROVADA em 27 de fevereiro de 2018, como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO, pela Banca Examinadora especificada a seguir:

  
Prof.ª Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí  
Presidente

  
Prof. Dr. Eduardo de Faria Viana  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí  
Membro titular

  
Prof. Dr. Guilherme Malafaia  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí  
Membro extra

  
Prof.ª Dra. Wanessa Fernandes Carvalho  
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia  
Membro titular

*“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez.”  
(George Bernard Shaw)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo impossível que se tornou possível, provando seu amor por mim. Em todos os momentos, foi Deus que esteve ao meu lado. Obrigada Pai!

Agradeço à minha mãe, Irací Ramos Braga que me ensinou a nunca desistir, a ser honesta e sempre dedicar 100% em todas as tarefas. Orgulho-me de ser sua filha, mamãe.

Agradeço à minha irmã, Denívia Ap. Braga Gomes, minha melhor amiga que, mesmo sendo mais nova, sempre foi a mais experiente. Minha psicóloga, minha alma gêmea, minha melhor metade.

Agradeço imensamente ao meu esposo Sérgio Andrygo Rodrigues de Faria. Meu companheiro, meu amor, a pessoa que ilumina meu coração de sublime felicidade. Sou grata por cuidar de mim, por me incentivar, por me completar. Aos meus sogros ( D. Marli e Sr. Antônio) que se preocupavam em todas as viagens e que me apoiaram sempre.

Agradeço à Joyce Moreira de Souza e à Bruna de Oliveira Mendes, colegas que conheci durante meu Mestrado e que hoje são minhas amigas. Cada momento de alegria e de risos foram com elas. Obrigada amigas por me auxiliarem em cada etapa deste trabalho. Foi com vocês que cresci como acadêmica.

Agradeço à Joceline Maria das Costas Soares, uma amiga que me deu apoio e me acomodou em seu pequeno espaço quando precisava de um cantinho longe de casa. À Márcia Rosa e ao Diogo Amaral pelos trabalhos realizados juntos e pela confiança nas parcerias realizadas durante as disciplinas.

Aos estudantes e pesquisadores do Laboratório de Pesquisas Biológicas do IF Goiano – Campus Urutaí, em especial ao Matheus, Thales, Abraão, Raíssa, Fernanda. Essa turma ajudou muito na condução do projeto e sua finalização.

Agradeço aos colaboradores do administrativo, Lúcia pela dedicação e Adriana pela simpatia.

À Profa. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues, minha orientadora, que acreditou em mim, que me deu a chance de voltar a sonhar que posso ir mais além. Posso dizer que encontrei uma amiga pra minha vida inteira.

Ao Prof. Dr. Guilherme Malafaia, meu coorientador, que aceitou que eu fizesse parte de sua equipe no laboratório. Confiou e me deu a oportunidade de crescer apesar das minhas limitações. Sou grata, pelo esforço comigo, pela responsabilidade de um trabalho tão sério.

Por fim, agradeço a todos os professores do Instituto Federal Goiano, campus Urutaí, que de alguma forma fizeram destes dois anos, uma virada na minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. Modelo experimental .....	16
2.2. Design experimental .....	18
2.3. Produto comercial Kraft® 36 EC .....	18
2.4. Testes Comportamentais.....	19
2.4.1. Procedimentos adotados.....	19
2.4.1.1. Aclimatização dos animais.....	19
2.4.1.2. Realização dos testes.....	20
a) Testes do campo aberto.....	20
b) Teste do reconhecimento do objeto.....	22
c) Teste de agressividade.....	23
d) Teste de resposta ao predador.....	25
e) Teste de agregação social.....	27
2.5. Consumo de água e avaliação clínica.....	28
2.6. Análise de dados.....	29
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGO 2.....</b>	<b>45</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>45</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>46</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>48</b>
2.1. Experimental model .....	48
2.2. Experimental design.....	48
2.3. Evaluations.....	49
2.3.1. Water intake and clinical evaluation.....	49
2.3.2. Micronuclei and nuclear changes.....	49

2.4. Data analysis.....	50
<b>3. RESULTS.....</b>	<b>50</b>
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>53</b>
<b>6. ACKNOWLEDGMENT.....</b>	<b>53</b>
<b>7. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS.....</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERENCES.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURES CAPTION.....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURES.....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 3 – CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1 - ARTIGO 1

- Figura 1-** Representação esquemática dos grupos experimentais organizados na sala experimental.....17
- Figura 2- Figura 2.** Imagem representativa demonstrando o cronograma de realização dos testes comportamentais de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* submetidas ou não à abamectina.....19
- Figura 3-** Representação esquemática da vista frontal do exterior (A) e do interior (B) do aparato utilizado no teste do campo aberto, ao qual fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina) foram submetidas.....21
- Figura 4-** Representação esquemática da primeira (A) e segunda sessão (B) do teste do reconhecimento de objeto, ao qual fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina) foram submetidas.....22
- Figura 5-** Representação esquemática da (A) vista frontal externa do aparato utilizado no teste de agressividade; (B) vista do interior do aparato com destaque para a divisória equitativa dos compartimentos; (C) destaque da retirada da repartição de madeira, deixando apenas a divisória de vidro transparente que separava os animais e (D) interação dos animais pelo vidro transparente que os separavam.....24
- Figura 6-** Representação esquemática da (A) vista frontal externa do aparato utilizado no teste de resposta ao predador, (B) vista do interior do aparato com destaque para as divisões das zonas (1, 2 e 3); (C) vista da sessão do teste sem o predador e (D) sessão do teste de resposta ao predador com o gato (estímulo predatório).....26
- Figura 7-** Vista frontal externa do aparato onde o teste de agregação foi realizado e (B) vista do interior do aparato. As cores são meramente ilustrativas.....27
- Figura 8-** Exemplo do protocolo utilizado para determinação do escore de cluster para cada grupo de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina).....28
- Figura 9-** (A) Biomassa inicial e final de fêmeas de *C. coturnix japonica* expostas ou não à água contaminada com abamectina; (B) Índice de Massa Corpórea Relativa (IMCR) de fêmeas de *C. coturnix japonica* expostas ou não à água contaminada com abamectina e (C) Biomassa relativa de diferentes órgãos.....30

<b>Figura 10-</b> (A) Latências para a locomoção; (B) total de cruzamentos, (C) frequência de exibição dos comportamentos de alta portura (D) e de <i>freezing</i> (D), de fêmeas de <i>Coturnix coturnix japonica</i> expostas ou não à abamectina.....	32
<b>Figura 11-</b> (A) Frequência de exibição dos comportamentos de alta postura e de (B) <i>freezing</i> , de fêmeas de <i>Coturnix coturnix japonica</i> (expostas ou não à abamectina) submetidas ao teste de reconhecimento.....	33
<b>Figura 12-</b> Frequência da exibição de comportamento de alta postura e (B) total de cruzamentos de <i>Coturnix coturnix japonica</i> expostas ou não à abamectina submetidas ao teste de agressividade.....	35
<b>Figura 13.</b> (A) Tempos de permanência na zona aversiva, (B) de exibição dos comportamentos de alta postura e (C) de <i>freezing</i> de fêmeas de <i>Coturnix coturnix japonica</i> expostas ou não à abamectina submetidas ao teste de resposta ao predador. (D) Escores de <i>cluster</i> obtido no teste de agregação.....	36

## CAPÍTULO 2 - ARTIGO 2

<b>Figura 1-</b> Average daily water consumption (mL) of female <i>C. coturnix japonica</i> exposed, or not, to water containing abamectin.....	60
<b>Figura 2-</b> Initial and final biomass of female <i>C. coturnix japonica</i> exposed, or not, to water contaminated with abamectin.....	61
<b>Figura 3-</b> (A) Relative biomass of different organs and (B) Relative Weight Index of female <i>Coturnix coturnix japonica</i> exposed, or not, to water contaminated with abamectin.....	63
<b>Figura 4-</b> Frequency of erythrocytes with nuclear abnormalities in female <i>C. coturnix japonica</i> exposed, or not, to water containing abamectin.....	65
<b>Figura 5-</b> Representation of erythrocytes and the morphology of nuclei observed in female <i>Coturnix coturnix japonica</i> exposed, or not, to water contaminated with abamectin (B1) ovoid - normal nucleus; (B2) asymmetrical constricted erythrocyte; (B3) symmetrical constricted erythrocyte; (B4) binucleated cell; (B5) moved nucleus; (B6) indented nucleus; and (B7) anucleated erythrocyte.....	66

### BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS DE *Coturnix coturnix japonica* EXPOSTAS À ABAMECTINA

#### RESUMO

A necessidade de produzir alimentos, visando atender a população mundial, demanda o uso de agroquímicos. Porém, sua utilização extensiva tem trazido sérios problemas e riscos ambientais, uma vez que estes podem causar modificações no ambiente, seja alterando as comunidades biológicas, seja pelas alterações físicas, físico-químicas e químicas que podem ocorrer nos componentes abióticos dos ecossistemas naturais. Nesse contexto, avaliou-se o efeito da exposição crônica de fêmeas de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) a abamectina (acaricida e inseticida) e suas possíveis interferências em diferentes comportamentos típicos da espécie. Para isso, utilizou-se 32 animais, com idade entre 35 e 40 dias distribuídos em 3 grupos (controle, ABA 1% e ABA 10%). O “grupo controle”: composto por codornas expostas apenas à água potável, sem abamectina; “grupo ABA 1% CL50”, composto por animais expostos à água contendo 15,5 mg a.i./L de abamectina (via formulação comercial Kraft® 36EC) e “grupo ABA 10% CL50”, composto por aves expostas à água contendo 155,0 mg a.i./L de abamectina. Ao final dos 40 dias de exposição, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (locomoção), reconhecimento de objeto (motivação social), agressividade (convívio social), resposta ao predador (sobrevivência) e agregação social (vulnerabilidade predatória). Os resultados obtidos sob o aspecto etológico revelam que os animais dos grupos ABA 1% e ABA 10% apresentaram falha ao detectar um predador, aumento no nível de medo e falta de motivação social. Pode-se concluir que a abamectina causa neurotoxicidade e citotoxicidade no modelo de ave estudado.

**Palavras-chave:** Aves, Comportamento animal, Abamectina, Poluição aquática, Neurotoxicidade, Resposta ao Predador.

# BEHAVIORAL BIOMARCATORS OF *Coturnix coturnix japonica* ABAMECTINE

## ABSTRACT

The need to produce food, in order to meet the world population, demands the use of agrochemicals. However, its extensive use has brought serious environmental problems and risks, as they may cause changes in the environment, whether by altering the biological communities, or by the physical, chemical-chemical and chemical changes that may occur in the abiotic components of natural ecosystems. In this context, the effect of chronic exposure of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) to abamectin (acaricide and insecticide) and its possible interference in different behaviors typical of the species was evaluated. For this, 32 animals, aged between 35 and 40 days, were distributed in 3 groups (control, ABA 1% and ABA 10%), the "control group": composed of quails exposed only to drinking water, without abamectin; "ABA 1% LC50 group", composed of water exposed animals containing 15.5 mg ai / L abamectin (via Kraft® 36EC commercial formulation) and "ABA 10% LC50 group", composed of water-exposed birds containing 155, 0 mg / ml abamectin. At the end of the 40 days of exposure, the animals were submitted to open field tests (locomotion), object recognition (social motivation), aggressiveness (social interaction), predator response (survival) and social aggregation (predatory vulnerability). The results showed that the animals of the 1% ABA and 10% ABA groups showed a failure to detect a predator, an increase in the level of fear and lack of social motivation. It can be concluded that abamectin causes neurotoxicity and cytotoxicity in the studied bird model.

**Keywords:** Birds, Animal Behavior, Abamectin, Aquatic Pollution, Neurotoxicity, Predator Response.

## 1. INTRODUÇÃO

Tem sido consenso na atualidade que o crescimento da população humana está diretamente ligado ao aumento da demanda por alimentos (Cheeseman, 2016). Webb & Buratini (2016) estimam que a população mundial aumentará de 9,6 bilhões para 12,3 bilhões em 2100, podendo chegar a 10 bilhões de pessoas ainda em 2056. Conseqüentemente, para suprir a necessidade de produzir alimentos, visando atender essa população em crescimento exponencial, o uso de agroquímicos (i.e.: agrotóxicos e fertilizantes) se tornou uma prática comum na maioria dos sistemas agricultáveis, especialmente no sistema de agricultura convencional (Cheeseman, 2016).

Entretanto, o uso intensivo e indiscriminado desses agroquímicos tem trazido sérios problemas e riscos ambientais, uma vez que estes podem causar modificações no ambiente, seja alterando as comunidades biológicas, seja pelas mudanças físicas, físico-químicas e químicas que podem ocorrer nos componentes abióticos dos ecossistemas naturais (Rivera-Becerril, 2016). Estudos prévios têm contribuído para o entendimento de como estes agroquímicos afetam o ambiente (Grue & Shipley, 1983; Tisler & Kozuh-Erzem, 2006; Ross et al., 2013; Casali-Pereira et al., 2015; Lu et al., 2015; Vanderlei, 2015; Bai & Ogbourne, 2016; Novelli et al., 2016; Vandermaesen et al., 2016).

Dentre os pesticidas utilizados na agricultura, destacam-se aqueles oriundos da família das avermectinas, principalmente a abamectina, a qual constitui o único composto desta família utilizado, tanto para proteção de cultivos agrícolas, quanto para fins farmacêuticos (Bai & Ogbourne, 2016). No Brasil, a abamectina é a única avermectina registrada como produto agrotóxico pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo que seu uso (via aplicação foliar) tem sido indicado para diferentes culturas, tais como algodão, batata, café, citros, coco, cravo, crisântemo, ervilha, feijão, figo, maçã, mamão, manga, melancia, melão, morango, pepino, pera, pêssego, pimentão, rosa, tomate e uva (MAPA, 2015).

Apesar da utilização da abamectina contribuir para o aumento da produção e produtividade agrícola, esse composto tem sido considerado um pesticida de alto risco ecotoxicológico (Bai & Ogbourne, 2016). Alguns estudos, como os de Novelli et al. (2016) e Bai & Ogbourne (2016), relatam que a abamectina possui efeito tóxico em ambientes aquáticos, mesmo quando presentes em baixas concentrações, podendo persistir no ambiente e contaminar produtos alimentares. Sua estrutura é caracterizada por lactonas macrocíclicas, produzidas naturalmente por fungos da espécie *Streptomyces avermitilis* no solo, os quais são altamente resistentes a nematoides e artrópodes (Thanomsit, 2016).

Fisiologicamente, a abamectina atua no sistema nervoso central dos organismos-alvo (i.e.: invertebrados, tais como nematoides e artrópodes), inibindo os impulsos elétricos ao interagir com

canais de cloro ativados por glutamato, ou, em organismos não-alvos, interagindo com canais de íons cloreto mediados por outros neurotransmissores, como o ácido gamaaminobutírico (GABA), comumente encontrado na maioria dos vertebrados (Õmura, 2008; Lumaret et al., 2012). Nos organismos-alvo a ligação da abamectina com tais canais os paralisa, podendo levá-los a óbito, como resultado da inibição da transmissão inter-neural e neuromuscular (Lumaret et al., 2012). Por outro lado, nos vertebrados (organismos não-alvo), as avermectinas também interagem com os receptores GABA; mas, sua afinidade pelos receptores de invertebrados é aproximadamente 100 vezes maior (Lumaret et al., 2012).

A partir do trabalho de Wislocki et al. (1989), sobre a taxa de degradação de abamectina, sua biodisponibilidade e sua absorção em sistemas biológicos, vários outros trabalhos já foram desenvolvidos, as quais buscaram identificar os efeitos deste pesticida sobre diferentes organismos, bem como seu mecanismo de ação (Lumaret et al., 2012). Dentre os invertebrados mais estudados, destacam-se os *Onthophagus* sp.; *Musca vetustissima*; *Folsomia cãndida*; *Tetranychus cinnabarinus*; *Eisenia fétida*; *E. andrei*; *Enchytraeus crypticus* e *Daphnia magna*. Já em relação ao grupo dos vertebrados, os estudos têm dado enfoque no grupo dos peixes (Tisler & Erzen, 2006; Noveli et al., 2016; Thanomsit et al. 2017) e anfíbios (Ardente et al. 2008; Li et al. 2014; Geng et al. 2016; Vasconcelos et al., 2017; Montalvão & Malafaia, 2017).

Em relação ao grupo das aves, existe apenas um estudo, o qual foi conduzido por Lankas & Gordon (1989) no laboratório *Wildlife International Ltd.* (Maryland, EUA). Neste estudo, os experimentos de toxicidade aguda revelaram que o pesticida não é muito tóxico para *Colinus virginianus* (espécie de codorna conhecida nos países anglófonos por "bobwhite") e para *Anas platyrhynchos* – uma ave anseriforme que habita áreas temperadas e subtropicais da América do Norte, Europa e Ásia. Este estudo foi importante para determinação da letalidade dessas aves ao serem expostas pelo pesticida contido na ração ofertada aos animais. Contudo, os autores não avaliaram qualquer aspecto para além da taxa de letalidade desses modelos experimentais, tais como alterações em seu repertório comportamental, determinante para sua sobrevivência, reprodução e perpetuação nos ecossistemas naturais. Logo, percebe-se que os estudos sobre os efeitos da exposição de aves à abamectina são muito escassos, o que reforça a necessidade de desenvolvimento de novas investigações (para além daquelas desenvolvidas em modelos invertebrados e vertebrados aquáticos), a fim de conhecer a real magnitude da contaminação de águas por este pesticida e sua consequente ingestão por representantes da classe das aves.

Assim, partindo-se da hipótese de que grandes áreas cultivadas podem receber abamectina como pesticida e que o escoamento de águas superficiais nessas áreas (a partir de chuvas) pode contaminar os cursos d'água que servem como fonte de água para as aves, o objetivo do nosso

estudo foi avaliar possíveis impactos da exposição de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* à água contendo o agrotóxico sobre diferentes comportamentos da espécie.

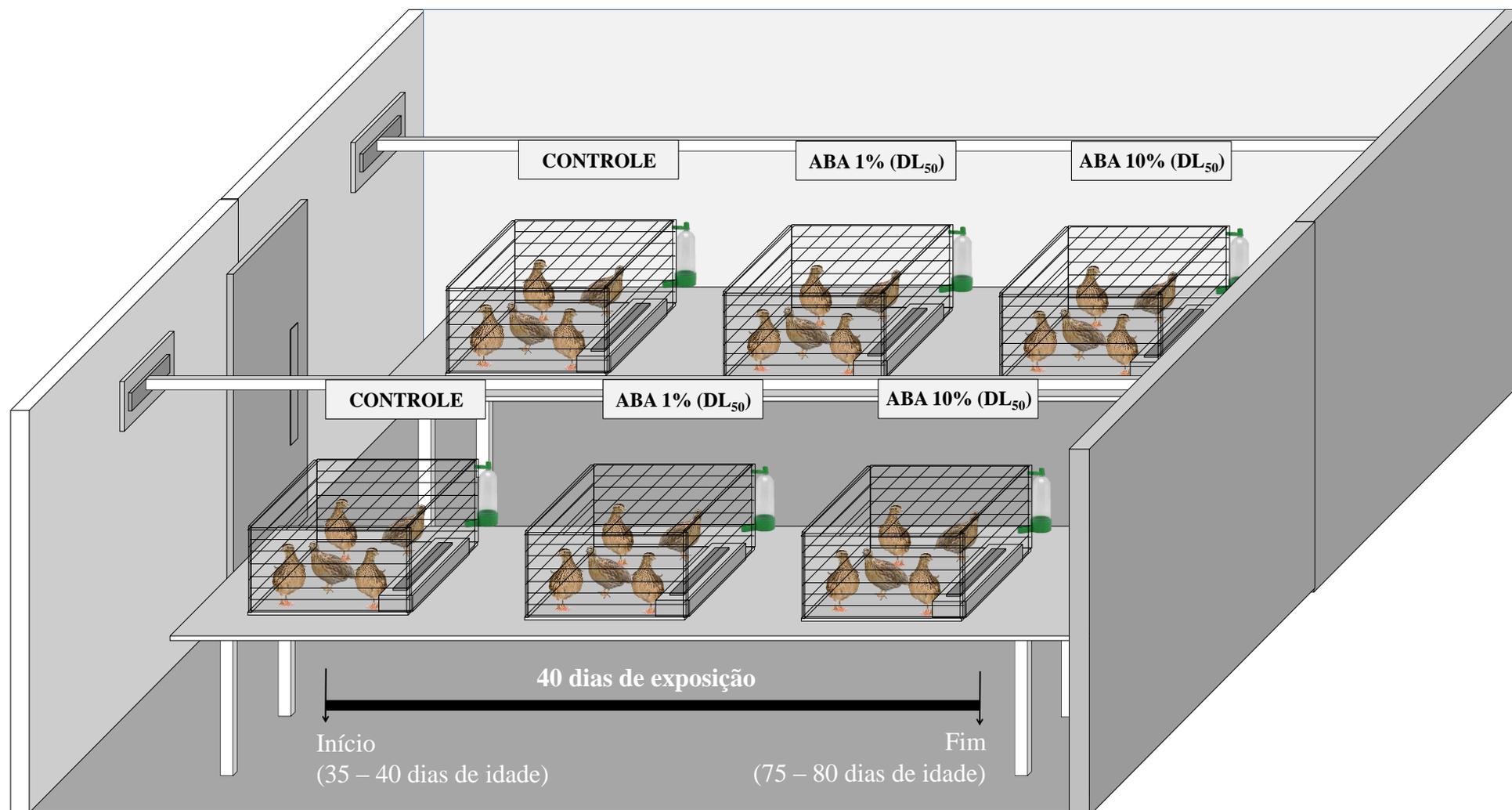
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Modelo experimental

Para a realização do nosso estudo foram utilizadas fêmeas de codornas da espécie *Coturnix coturnix japonica*. Tal espécie tem grande capacidade de adaptação e reprodução em cativeiro e é classificada pela Lista Vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), como pouco preocupante (IUCN, 2016). Além disso, o fácil manuseio em cativeiro, a resistência a doenças e baixo custo de manutenção faz com que essa espécie seja considerada um excelente modelo experimental para estudos de pequenas aves, conforme discutido por Romijn (1995) e Quinn-Jr (2012). Por outro lado, sabe-se que machos de *C. coturnix japonica* são mais agressivos, quando comparados às fêmeas e desenvolvem rapidamente uma hierarquia social quando criados no mesmo recinto (Mills, 1997). Nesse sentido, optamos por trabalhar com fêmeas a fim de minimizar possíveis efeitos negativos de comportamentos naturalmente agressivos ao longo do período experimental, especialmente, nos grupos que receberiam os tratamentos e, isso, pudesse interferir nos resultados.

Todos os animais foram adquiridos em criadouro comercial (Pires do Rio, GO, Brasil) e, após a divisão equitativa da massa corporal, as codornas foram distribuídas em seis gaiolas de aço (de dimensões: 37,5 cm de comprimento x 34 cm de largura x 22 cm de altura), com cinco animais por gaiola (27 cm<sup>2</sup>/animal) (Figura 1). Em seguida, as aves foram mantidas em uma sala experimental com controle de temperatura (24 a 25° C) e luminosidade (12 h de ciclo claro), conforme Hussain (2014). Além disso, as codornas receberam ração padrão para codornas *ad libitum*. Os bebedouros ofertados aos animais foram do tipo “chiristino” e a ração foi fornecida em comedouro do tipo calha de chapa galvanizada (Figura 1).

A água com e sem o pesticida foi oferecida *ad libitum* e a ração foi repostada diariamente nos períodos matutino (8 h 30 min) e vespertino (16 h 30 min). A higienização das gaiolas foi realizada três vezes por semana. Salienta-se que ao longo do período experimental evitou-se ao máximo interferências externas, tais como batidas de portas, conversas altas na sala experimental, odores externos (i.e.: perfumes); dentre outros. Nosso intuito foi evitar estímulos ambientais estressores que pudessem influenciar os animais, proporcionando-lhes comportamentos indesejáveis, como bicagem das penas, agressão uns aos outros, desvio social ou comportamento depressivo visível (e.g., inanição, empenamento prejudicado e/ou letargia).



**Figura 1.** Representação esquemática dos grupos experimentais organizados na sala experimental. “Grupo controle”: animais expostos apenas à água potável, sem abamectina; “grupo ABA 1% DL<sub>50</sub>”: animais expostos à água contendo 15.5 mg a.i./L de abamectina; e “grupo ABA 10% DL<sub>50</sub>”: animais expostos à água contendo 155.0 mg a.i./L de abamectina. n=10, por grupo experimental.

## 2.2. Design experimental

Um total de 32 animais, com idade entre 35 e 40 dias, foi distribuído em três grupos experimentais: i) “grupo controle” (n=10), no qual os animais receberam apenas água potável (sem abamectina); ii) “grupo ABA 1% (DL<sub>50</sub>)” (n=10), que recebeu 1% da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) de abamectina (31,02 mg/L da formulação comercial Kraft® 36 EC = 15,5 mg a.i./L de abamectina) identificada em estudo prévio (Lankas & Gordon 1989) e iii) “grupo ABA 10% (DL<sub>50</sub>)” (n=10), composto por animais que receberam 10% da referida DL<sub>50</sub> (310,2 mg/L de Kraft® 36 EC = 155,0 a.i./L de abamectina).

Salienta-se que as diluições do pesticida foram preparadas diariamente, momentos antes de serem ofertadas aos animais. O período de exposição dos animais ao pesticida foi de 40 dias, definido propositalmente a fim de coincidir com o período que antecede o pico postural das fêmeas. De acordo com Albino & Barreto (2003), as fêmeas de codornas começam a manifestar seu desenvolvimento sexual em torno de seis a sete semanas de idade, sendo nesse período que surgem os primeiros ovos, e a produção eleva-se linearmente, atingindo o pico de postura por volta da 12ª a 14ª semana de vida (84 a 98 dias). No ápice de produção, as codornas apresentam um aumento natural da agressividade, acompanhado de mudanças fisiológicas que culminam em alterações biológicas importantes que podem influenciar diretamente seus comportamentos (Jardim Filho, 2006). Portanto, optamos por finalizar o experimento quando os animais estavam com idade entre 75 e 80 dias de vida (40 dias de exposição).

## 2.3. Produto comercial Kraft® 36 EC

O produto comercial utilizado no presente estudo foi o Kraft® 36 EC (Bayer CropScience Ltda., Belford Roxo – RJ, Brasil), classificado como acaricida, inseticida e nematicida. Devido à sua eficácia no controle de pragas, o Kraft® 36 EC é um dos pesticidas mais utilizados no Brasil e possui registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o nº 7703 para utilização em 23 diferentes culturas, tais como feijão, tomate e batata (MAPA, 2013). Ainda, segundo o MAPA, a classificação toxicológica do Kraft 36 EC® é classe I, ou seja, extremamente tóxico, sendo altamente persistente e muito perigoso ao ambiente e à biota (MAPA, 2013).

Todas as concentrações definidas no presente estudo foram consideradas como valores nominais. Para confirmar as concentrações nominais de abamectina, amostras de 15,5 mg a.i./L e 155,0 a.i./L de abamectina foram analisadas por HPLC/MS/MS Agilent 1 6490 (Zorbax Eclipse plus C18 Agilent column) tendo revelado que as concentrações avaliadas foram 97,8% ± 4.7 das concentrações nominais (média ± desvio padrão, n = 8 amostras, cada).

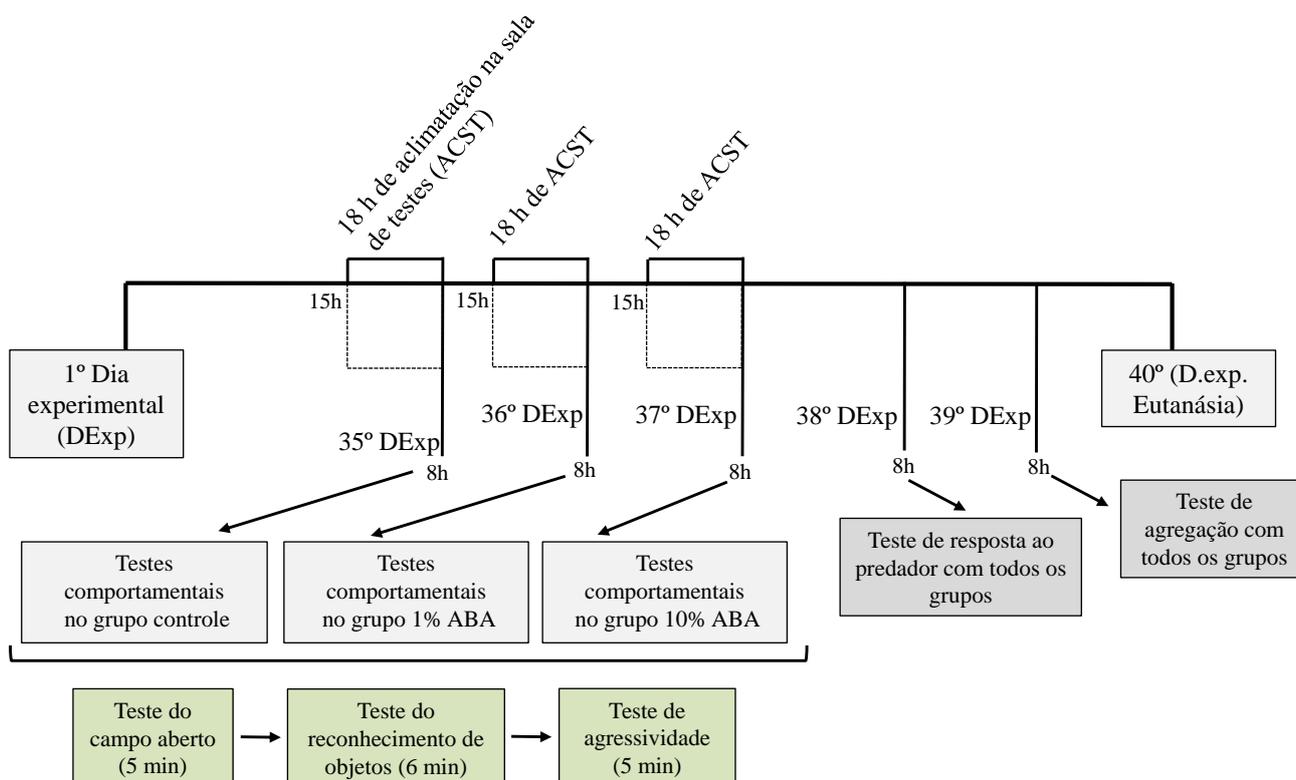
## 2.4. Testes comportamentais

Considerando a hipótese de que a ingestão de água contendo abamectina pudesse levar a danos no sistema nervoso central de animais não alvo, como as aves, a partir do 35º dia experimental, as codornas foram submetidas a diferentes testes comportamentais, conforme detalhado a seguir.

### 2.4.1. Procedimentos adotados

#### 2.4.1.1. Aclimatização dos animais

Antes dos testes comportamentais, cada grupo de codornas (n=10), foi alojado por 18 h em uma sala similar àquela na qual iriam ser realizados os testes, visando sua aclimação ao ambiente novo. A sala de testes possuía isolamento acústico, iluminação artificial, temperatura controlada (23 a 25°C) e duas câmeras de vídeo acopladas a um computador localizado externamente. Os animais foram submetidos sequencialmente, ao teste de campo aberto, reconhecimento de objeto e teste de agressividade em um mesmo dia para evitar estresse aos animais, conforme pode ser observado na Figura 2.



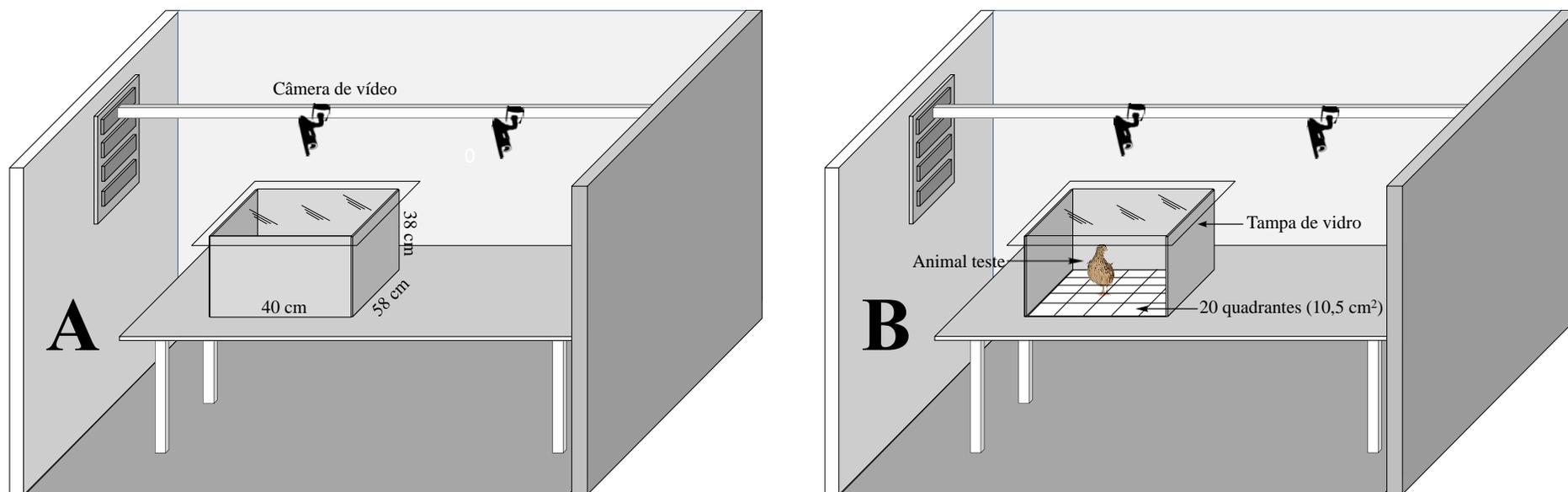
**Figura 2.** Imagem representativa demonstrando o cronograma de realização dos testes comportamentais de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* submetidas ou não à abamectina.

#### **2.4.1.2. Realização dos testes**

##### **a) Teste do campo aberto**

No presente estudo o teste do campo aberto foi adaptado para aves, conforme procedimentos metodológicos utilizados por Satterlle & Marin (2006) e Formanek (2008). Para isso, foi utilizada uma caixa de cor branco fosco com dimensões de 58 cm de largura x 38 cm de altura x 40 cm de comprimento (Figura 3A). No fundo da caixa haviam 20 quadrantes de 10,5 cm<sup>2</sup> (Figura 3B). Após o período de aclimatação (5 min na sala de testes), cada ave foi colocada individualmente no centro do aparato, com o bico virado para o lado direito e, em seguida, para evitar a fuga do animal foi colocado um vidro transparente na parte superior da caixa (Figura 3B). Em seguida, cada animal foi filmado por 5 min e, a cada sessão do teste, o aparato era higienizado com álcool 70%.

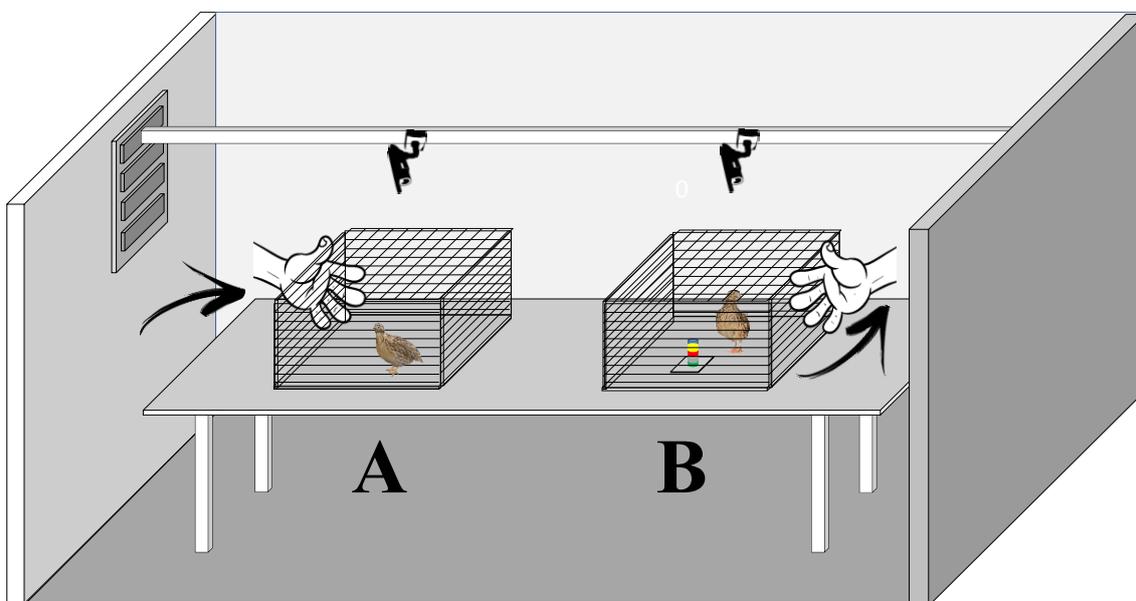
Posteriormente, foram avaliados os seguintes parâmetros: latência para locomoção (primeiro passo do animal); total de cruzamentos dos quadrantes, frequência de exibição de comportamento de *freezing* [completo silêncio e inatividade do animal e/ou ligeiros movimentos associados à respiração, conforme descrito por Satterlee & Marin, (2006)] e frequência de alta postura [quando os animais ficam em pé na ponta dos dedos com seus corpos eretos, conforme descrito por Formanek et al. (2008)]. Tais parâmetros foram avaliados com o auxílio do *software* PlusMZ.



**Figura 3.** Representação esquemática da vista frontal do exterior (A) e do interior (B) do aparato utilizado no teste do campo aberto, ao qual fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina) foram submetidas. As cores são meramente ilustrativas.

## b) Teste do reconhecimento de objeto

Para a realização do teste do reconhecimento de objeto foi utilizado uma gaiola metálica (38 cm de comprimento x 29 cm de largura x 37 cm de altura) e um objeto colorido (Figura 4). Tal objeto consistiu em um cilindro de polipropileno com 10 cm de altura, fixado a uma base de 5 cm, com divisões de 1 cm nas cores azul, vermelho, amarelo, cinza e verde. A escolha dessas cores foi baseada em estudos prévios (Salzen et al., 1971; Roper & Marples, 1997, Mills et al., 1997), os quais reportam que as aves são mais sensíveis às cores relacionadas à alimentos que transmitem comprimentos de onda de luz longos (vermelho e amarelo) e objetos que transmitem comprimento de onda curto (azul, verde), ou seja, cores de cromaticidades opostas. O teste do reconhecimento de objeto foi realizado em duas sessões. Na primeira sessão, após introduzir o animal, o pesquisador colocava sua mão (sem qualquer objeto) no interior do aparato, realizando movimentos que simulavam a introdução de um objeto (Figura 4A). Na sequência, o animal era filmado por 3 min.



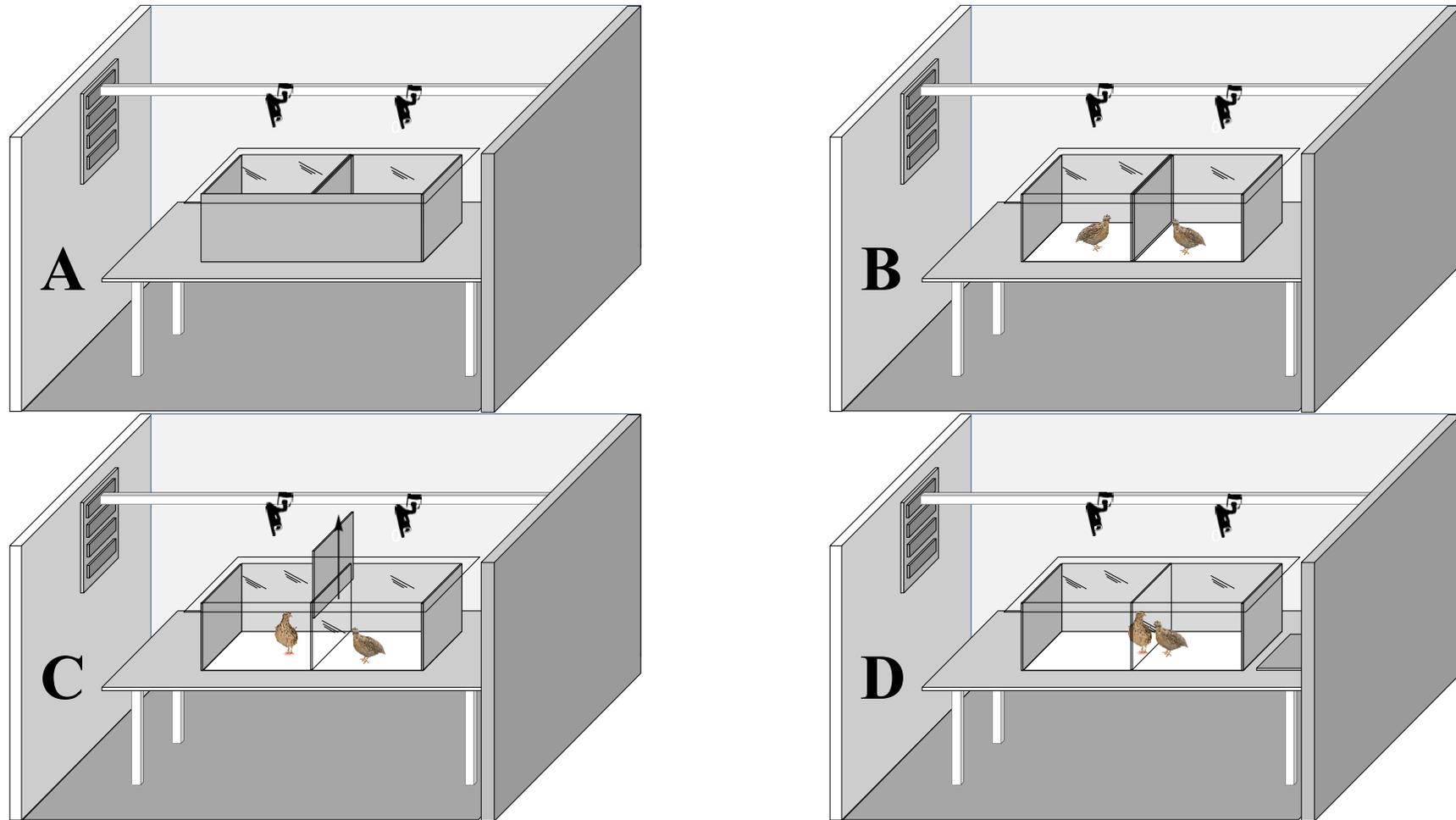
**Figura 4.** Representação esquemática da primeira (A) e segunda sessão (B) do teste do reconhecimento de objeto, ao qual fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina) foram submetidas. As cores são meramente ilustrativas.

Na segunda sessão do teste, o pesquisador introduzia no interior da gaiola o objeto (Figura 4B) e, na sequência, a ave era filmada por mais 3 min. Posteriormente, foram analisados os seguintes parâmetros: frequência de exibição do comportamento de *freezing* e de alta postura, na primeira e segunda sessões. Todos os parâmetros comportamentais também foram analisados com o auxílio do *software* PlusMZ.

### c) Teste de agressividade

Os procedimentos adotados no teste de agressividade foram baseados no estudo de Schlinger et al. (1987), com algumas modificações. Para isso, foi utilizada uma caixa em madeira (branca fosca) com dimensões de 60 cm de comprimento x 30 cm de largura x 20 cm de altura (Figura 5A), separada por dois compartimentos iguais, conforme demonstrado na Figura 5B. Tais compartimentos foram divididos por duas placas, uma de vidro transparente e uma de madeira. Na primeira sessão do teste cada ave “teste” foi colocada em um dos compartimentos, de modo que a codorna introduzida não enxergasse a ave coespecífica não familiar previamente colocada no compartimento oposto.

Após 1 min, a repartição de madeira entre os compartimentos era retirada (Figura 5C), permanecendo apenas a repartição de vidro (Figura 5D). Em seguida, deixaram-se as aves interagirem por um período de 4 min e, a cada sessão de teste, o aparato era higienizado com álcool 70%. Posteriormente, os seguintes parâmetros foram avaliados: frequência de bicadas fortes na repartição de vidro e a atividade locomotora das aves neste teste, utilizando-se para isso, o *software* PlusMZ. Ressalta-se que a atividade locomotora das aves foi avaliada pelo total de cruzamentos de linhas virtuais que dividiram o compartimento onde estava a ave “teste” em setores na tela do computador durante a análise das filmagens.



**Figura 5.** Representação esquemática da (A) vista frontal externa do aparato utilizado no teste de agressividade; (B) vista do interior do aparato com destaque para a divisória equitativa dos compartimentos; (C) destaque da retirada da repartição de madeira, deixando apenas a divisória de vidro transparente que separava os animais e (D) interação dos animais pelo vidro transparente que os separavam. As cores são meramente ilustrativas.

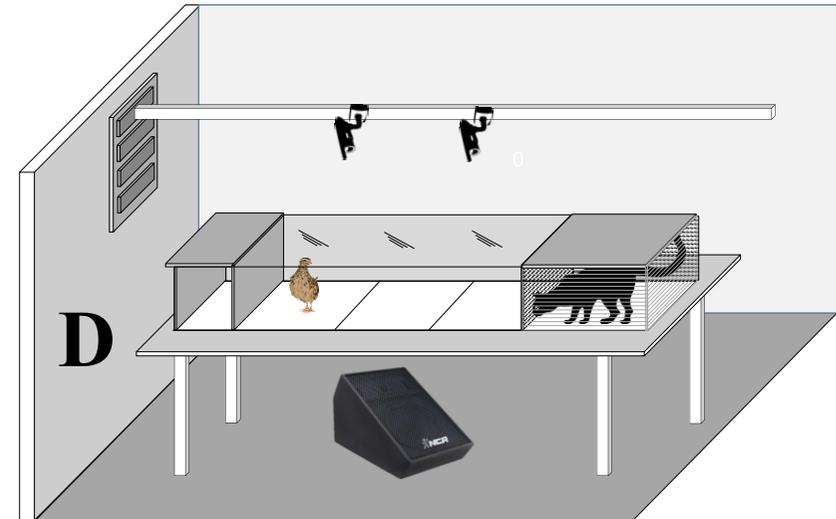
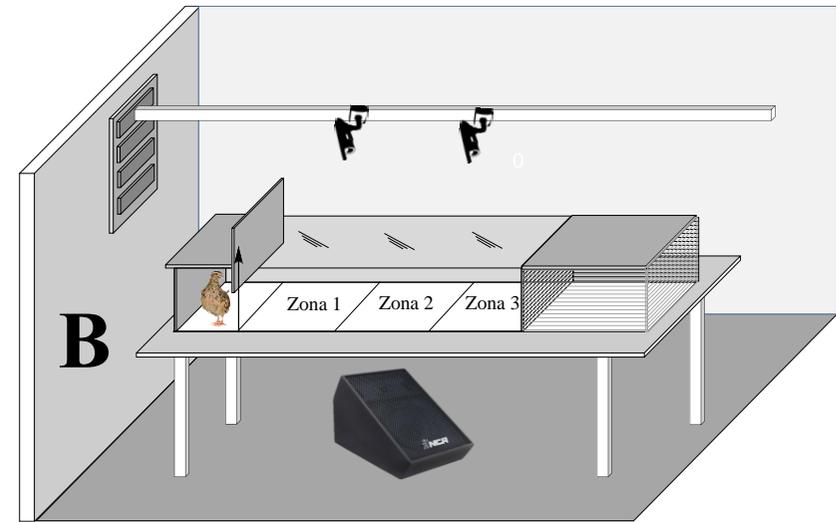
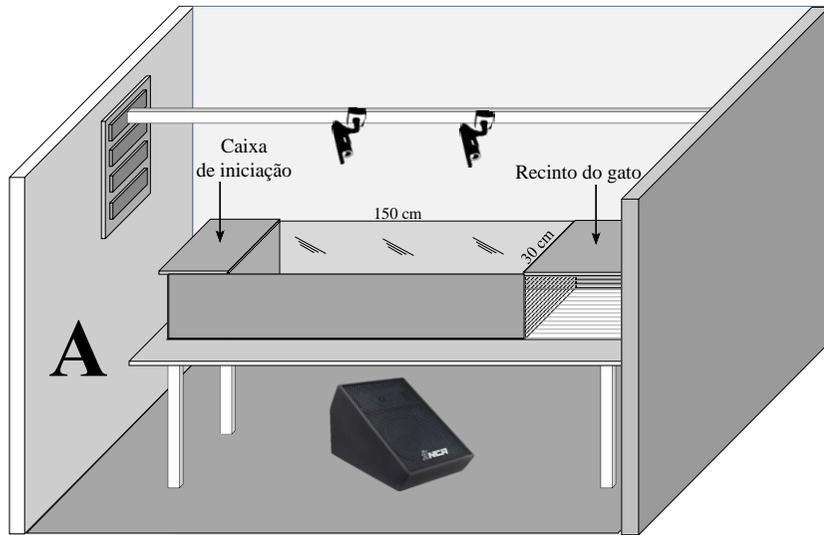
#### d) Teste de resposta ao predador

O teste de resposta ao predador teve como objetivo verificar o comportamento das aves frente a um potencial predador, de modo que foi oferecido às aves estímulo visual, auditivo e olfatório, tendo sido utilizado como predador um gato macho (*Felis catus*), adulto de cor agouti, semelhantemente ao estudo de Mendes et al. (2017), envolvendo camundongos. Salienta-se que o gato utilizado no teste era doméstico, o qual foi deixado em jejum por 12 h antecedentes ao início do teste e colocado em um recinto (nas seguintes dimensões: 60 cm de comprimento x 40 cm de largura e 40 cm de altura) (Figura 6A).

O aparato para realização do teste consistiu em uma caixa de madeira (branco fosco em todos os lados com as seguintes dimensões: 150 cm de comprimento x 30 cm de largura x 30 cm de altura) (Figura 6A). A caixa era dividida em distintas regiões, denominadas de zonas 1, 2 e 3 (Figura 6B). A zona 1 ficava mais distante do predador, sendo classificada como zona de segurança; a zona 2 ficava na parte intermediária do aparato e foi denominada de zona neutra. Já a zona 3, era a mais próxima do predador e, portanto, foi denominada de zona aversiva, como representado na Figura 6B.

Além disso, ao aparato foi acoplada uma caixa (30 cm<sup>2</sup>), denominada de caixa de iniciação (Figura 6A). O teste foi iniciado com a introdução de cada codorna na caixa de iniciação com a porta aberta, permitindo ao animal explorar o aparato (sem o predador), por 5 minutos (período de habituação) (Figura 6B-C). Após esse período, o animal era retirado do aparato e colocado novamente na caixa de iniciação, a qual era fechada por alguns instantes até que o gato fosse introduzido no recinto que já se encontrava acoplado ao aparato. Em seguida, a caixa de iniciação era cuidadosamente aberta, permitindo à ave explorar o aparato por mais 5 minutos (Figura 6D).

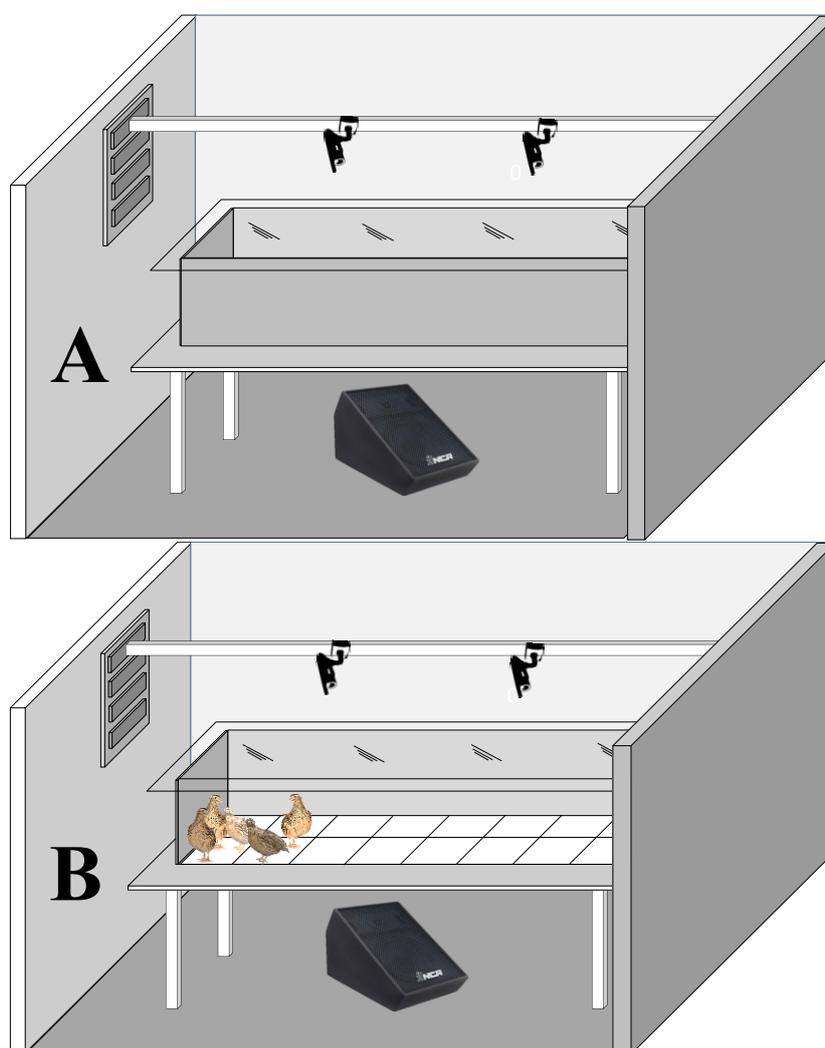
Vale salientar que a vocalização de um gato foi reproduzida na sessão de teste em que o predador era introduzido. Este som foi reproduzido duas vezes ao longo da sessão de teste, durante 20 s ininterruptos, por meio de uma caixa sonora instalada no interior da sala de testes (65 dB). Nesse caso, o objetivo de reproduzir o som do gato era garantir o estímulo sonoro do predador ao longo de todas as sessões testes. Ressalta-se que o som reproduzido foi gravado previamente pelos pesquisadores, semanas antes do teste comportamental. O volume do som reproduzido foi determinado por meio da aferição da vocalização do animal, utilizando-se um decibelímetro digital. Após a filmagem, os seguintes parâmetros foram analisados: tempo (s) de permanência na zona aversiva e tempo (s) de exibição de comportamento de *freezing* e de alta postura.



**Figura 6:** Representação esquemática da (A) vista frontal externa do aparato utilizado no teste de resposta ao predador, (B) vista do interior do aparato com destaque para as divisões das zonas (1, 2 e 3); (C) vista da sessão do teste sem o predador e (D) sessão do teste de resposta ao predador com o gato (estímulo predatório). As cores são meramente ilustrativas.

### e) Teste de agregação social

O teste de agregação foi adaptado dos trabalhos de Collins et al. (2011) e Parker et al. (2014). Com o objetivo de avaliar a agregação das codornas em resposta a um estímulo predatório, foi instalada na sala de testes uma caixa de som (acoplada a um computador) que iria reproduzir o som de uma ave de rapina. Sequencialmente, foi utilizado um aparato que consistiu em uma caixa retangular de madeira com as seguintes dimensões: 120 cm de comprimento x 30 cm de largura x 30 cm de altura (Figura 7A), dividida em 12 quadrantes (Figura 7B). As aves foram colocadas uma a uma (n=5; obedecendo as divisões dos grupos experimentais inicialmente descritas) dentro do aparato, o qual foi posteriormente fechado com uma tampa de vidro transparente, a fim de evitar a fuga dos animais (Figura 7B).

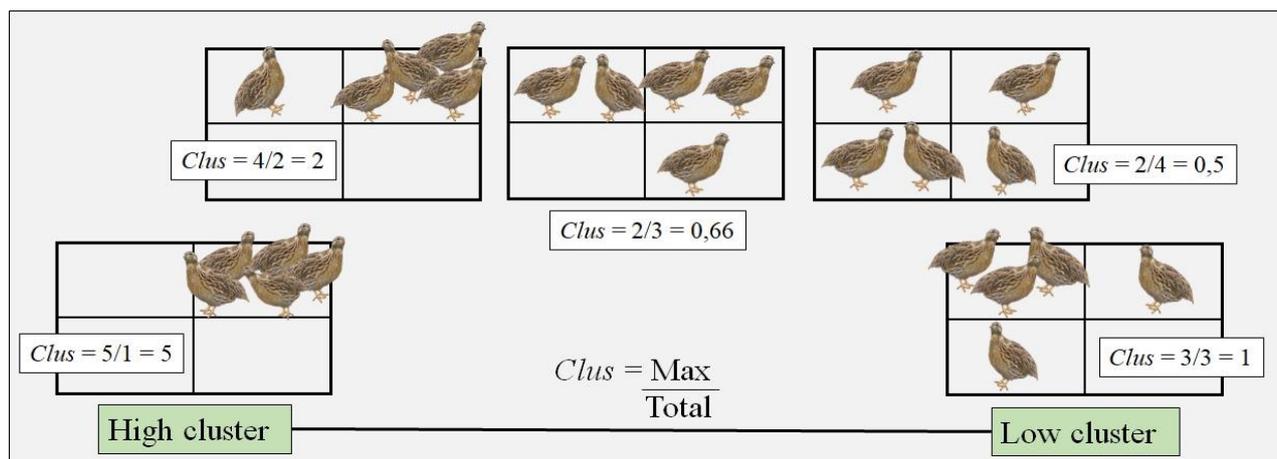


**Figura 7.** (A) Vista frontal externa do aparato onde o teste de agregação foi realizado e (B) vista do interior do aparato. As cores são meramente ilustrativas.

Assim que todas as aves foram colocadas no aparato, deixou-as habituar por 4 min e, em seguida, reproduziu-se a vocalização de um gavião (*Rupornis magnirostris*) (70 dB). Tal espécie foi escolhida devido ao fato dessa ave ser um predador de pequenas aves, conforme descrito por Santos

& Rosado (2009). Este som era reproduzido a cada 1 min e 40 s por 25 s ininterruptos. Salienta-se que entre uma sessão e outra do teste o aparato era higienizado com álcool 70%.

A análise da agregação social dos animais deu-se a partir do estabelecimento de escores de *cluster* para intervalos de 20 s em 20 s durante o período de 4 min (240 s), conforme metodologia adaptada de Collins et al. (2011). Os escores de *cluster* foram calculados dividindo o número máximo de codornas em uma seção pelo número de seções ocupadas pelos animais (total), provendo assim um escore de *cluster* para cada intervalo de tempo (20 s) analisado (Figura 8).



**Figura 8.** Exemplo do protocolo utilizado para determinação do escore de cluster para cada grupo de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina). As cores são meramente ilustrativas

## 2.5. Consumo de água e avaliação clínica

A fim de verificar se a exposição à abamectina causou aversão à água contaminada e uma possível desidratação dos animais, o consumo de líquidos foi aferido diariamente, por meio da subtração diária entre a cota oferecida e o rejeito do dia subsequente. Além disso, ao longo do período experimental os animais foram monitorados diariamente e avaliados quanto aos seguintes sinais clínicos de toxicidade: incapacidade locomotora, queda de penas, respiração superficial, diarreia, regurgitação, palidez nas mucosas, ataxia, convulsões e cegueira.

Ao final do experimento, o Índice de Massa Corpórea Relativa (IMCR) foi calculado para cada codorna, a fim de avaliar se a exposição ao pesticida teria impacto na composição corporal dos animais. O IMCR foi calculado de acordo com Souza et al. (2017), da seguinte forma: medida do tarso direito(mm)/biomassa corpórea (g). Além disso, a massa relativa do fígado, coração, infundíbulo, útero, cérebro, ovário e istmo foram calculadas. Para isso, a massa dos referidos órgãos foi normalizada para a biomassa corpórea, utilizando a seguinte fórmula: massa de cada órgão (g)/biomassa corpórea (g).

## 2.6. Análise dos dados

Inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, que foi seguido pelo teste Levene de homogeneidade de variância. Os dados referentes às massas relativas dos órgãos e aos parâmetros obtidos nos testes do campo aberto, agressividade e agregação foram submetidos à análise de variância simples (*one-way* ANOVA), com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade, nos casos significativos. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que nos casos significativos, as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Dunn's, também a 5% de probabilidade.

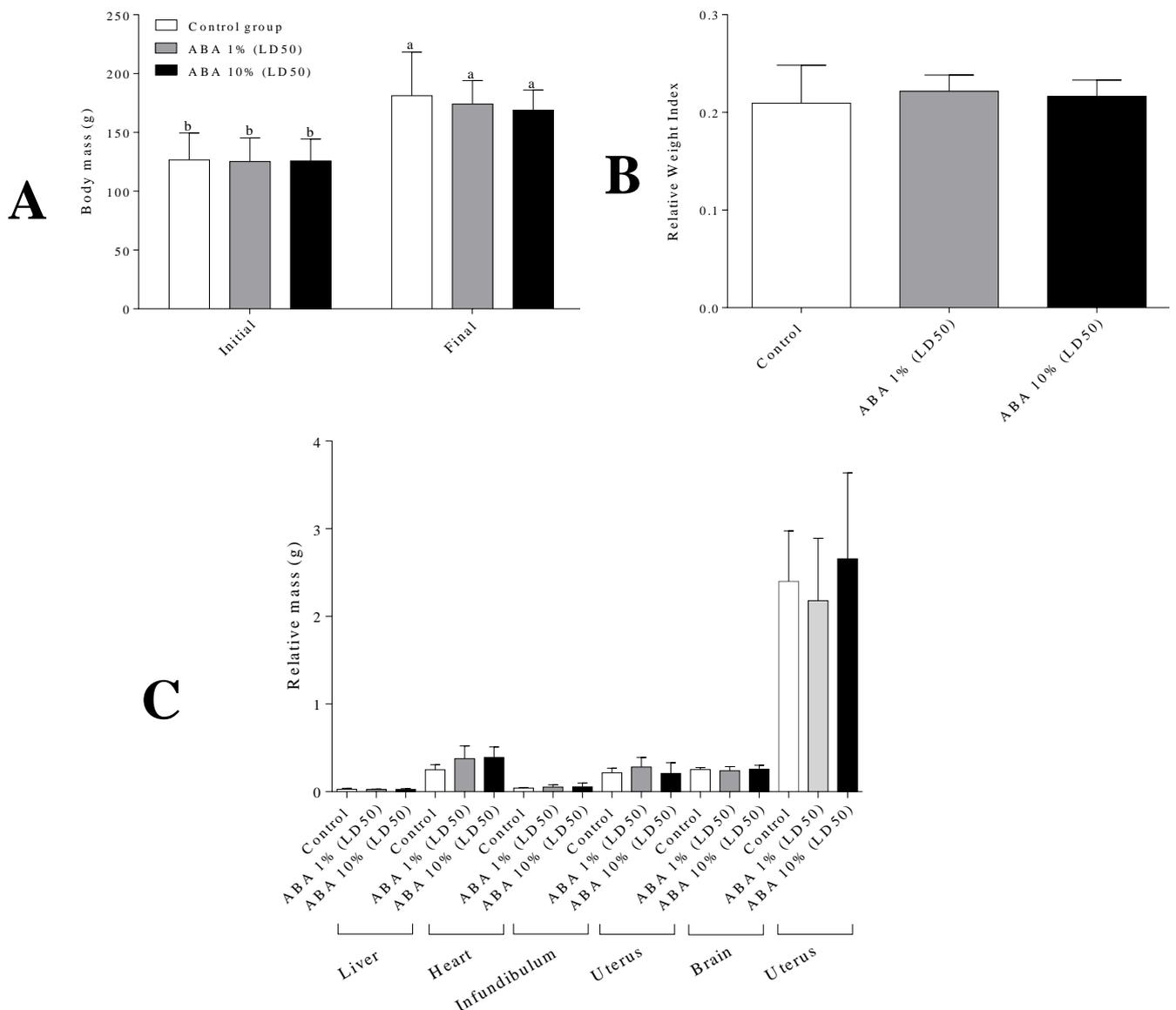
Já os dados referentes à biomassa corpórea e aqueles obtidos nos testes de reconhecimento do objeto e resposta ao predador foram submetidos à *two-way* ANOVA de acordo com o projeto fatorial 2x3, utilizando os fatores “tratamento” [três níveis: controle, ABA 1% (DL<sub>50</sub>) e ABA 10% (DL<sub>50</sub>)] e o fator “tempo” (dois níveis: início e fim do experimento- no caso dos dados de biomassa corpórea), fator “estímulo 1” (dois níveis: ausência e presença do objeto – no caso do teste de reconhecimento de objeto) ou fator “estímulo 2” (dois níveis: sem e com estímulo predatório – no caso do teste de resposta ao predador). Nos casos de F significativo, as múltiplas comparações foram realizadas pelo pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Ressalta-se que o dados não paramétricos foram transformados em log(x) para somente, a posteriori, serem submetidos à *two-way* ANOVA. Todas as análises e elaboração dos gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 6.0).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental os animais expostos à ingestão de água contendo abamectina não apresentaram qualquer sinal clínico de toxicidade. Além disso, observamos que tanto ao longo do período experimental, quanto ao seu final, as avaliações clínicas das aves não evidenciaram sinais relacionados com a desidratação, descartando a possibilidade de que os animais pudessem apresentar menor consumo de líquidos em razão da aversão à água contaminada. Nesse caso, nenhuma diferença estatística foi observada entre a média de consumo de água dos grupos ( $F_{(2,52)} = 1,307$ ;  $p = 0,279$ ) (gráfico não apresentado).

Por outro lado, o exame físico dos animais revelou um ganho de massa corpórea nos animais de todos os grupos experimentais quando comparadas suas massas iniciais e finais foram comparados (Figura 9A). Tal resultado já esperado, considerando o crescimento/desenvolvimento das aves durante o período de exposição, uma vez que, o experimento foi iniciado quando os animais ainda estavam em um período juvenil. Portanto, as análises estatísticas revelaram efeito apenas do fator “tempo” ( $F_{(2,52)} = 63,50$ ;  $p < 0,0001$ ) sobre o parâmetro biomassa corpórea.

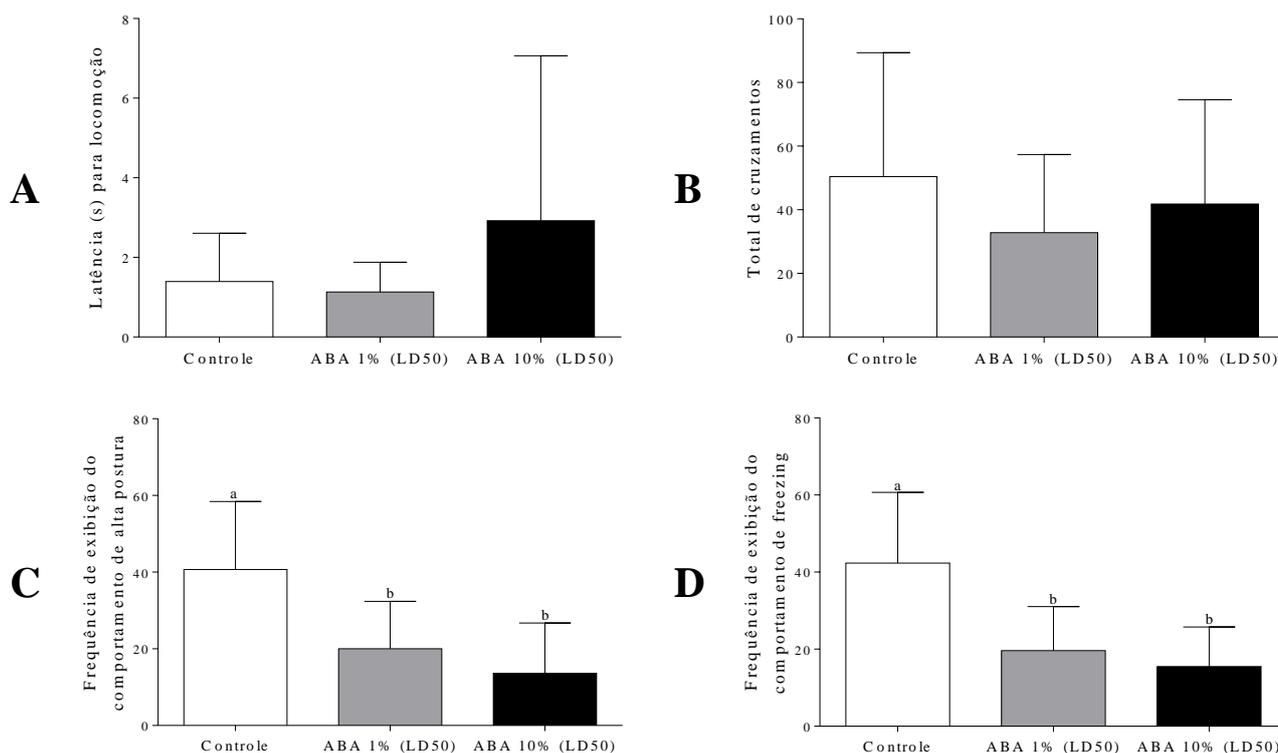
Entretanto, não observamos nenhuma diferença entre a massa relativa do fígado ( $F_{(2,27)} = 0,626$ ;  $p = 0,542$ ); coração ( $F_{(2,27)} = 3,212$ ;  $p = 0,060$ ), infundíbulo ( $F_{(2,27)} = 0,483$ ;  $p = 0,622$ ), útero ( $F_{(2,27)} = 1,599$ ;  $p = 0,221$ ), cérebro ( $F_{(2,27)} = 0,474$ ;  $p = 0,627$ ) e ístimo ( $F_{(2,27)} = 0,860$ ;  $p = 0,435$ ) (Figura 9C) dos grupos experimentais. Além disso, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre o IMCR calculado para os animais dos distintos grupos ( $F_{(2,52)} = 0,485$ ;  $p = 0,621$ ) (Figura 9B). Logo, pode-se dizer que os tratamentos não afetaram os índices somáticos das aves avaliadas, bem como que o pesticida utilizado não foi hábil em causar sinais típicos de toxicidade sistêmica nos animais.



**Figura 9.** (A) Biomassa inicial e final de fêmeas de *C. coturnix japonica* expostas ou não à água contaminada com abamectina; (B) Índice de Massa Corpórea Relativa (IMCR) de fêmeas de *C. coturnix japonica* expostas ou não à água contaminada com abamectina e (C) Biomassa relativa de diferentes órgãos e. As barras representam a média + desvio padrão dos dados originais. Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas, pela análise de variância fatorial (two-way ANOVA), a 5% de probabilidade. “Grupo controle”: animais expostos apenas à água potável, sem abamectina; “grupo ABA 1% DL<sub>50</sub>”: animais expostos à água contendo 15.5 mg a.i./L de abamectina; e “grupo ABA 10% DL<sub>50</sub>”: animais expostos à água contendo 155.0 mg a.i./L de abamectina. n=10, por grupo experimental.

Uma vez que não foi identificado qualquer sinal visível de toxicidade sistêmica que pudessem interferir no comportamento dos animais, nós submetemos as codornas ao teste do campo aberto, o qual teve o intuito de avaliar a capacidade locomotora dos animais. Assumimos que aqueles animais que apresentassem prejuízos locomotores poderiam ter uma resposta prejudicada nos testes subsequentes e que, do ponto de vista ecológico, deficiências na locomoção podem implicar em prejuízos reprodutivos e termorregulatórios, por exemplo, colocando em risco a sobrevivência dessas aves. Nós observamos que as codornas expostas aos tratamentos não apresentaram déficit locomotor neste teste, uma vez que a latência para a locomoção ( $H = 0,201$ ;  $p = 0,904$ ) (Figura 10A) e o total de cruzamentos dos quadrantes ( $H = 0,642$ ;  $p = 0,725$ ) do aparato não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 10B). Tais dados evidenciam que os tratamentos não causaram hiper ou hipoatividade (sedação) nos animais, ainda que a ação da abamectina nos vertebrados esteja associado à sua interação com receptores GABA, podendo diminuir ou inibir a transmissão inter-neural e neuromuscular, conforme discutido por Lumarat et al. (2012).

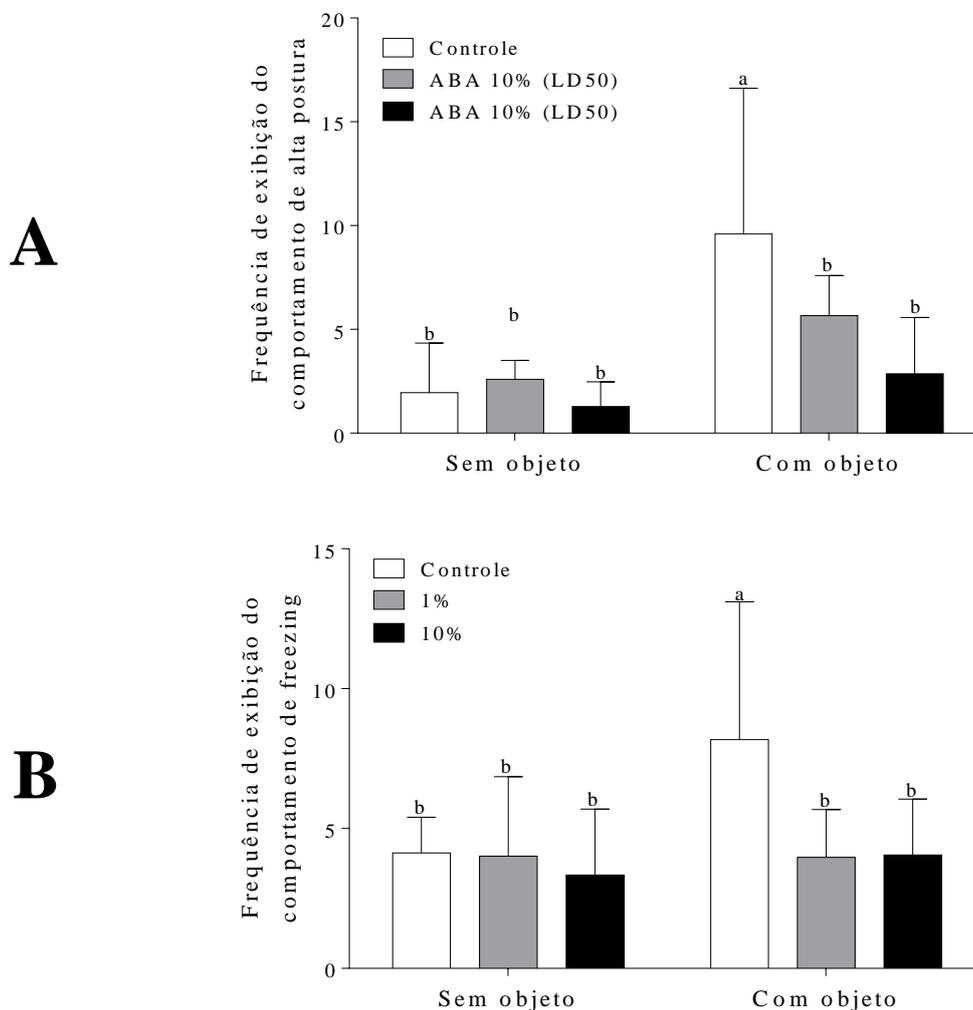
Por outro lado, considerando que o teste do campo aberto consiste em transferir o animais de um ambiente familiar para um ambiente novo (Formanek et al. 2008), tal paradigma também pode ser utilizado para avaliação da emocionalidade das codornas, permitindo avaliarmos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos dos tratamentos. Nesse contexto, nossos dados revelam que as codornas expostas ao pesticida apresentaram menor frequência de alta postura ( $F_{(2,27)} = 8,908$ ;  $p = 0,001$ ) (Figura 10C) e de *freezing* ( $F_{(2,27)} = 10,51$ ;  $p = 0,0005$ ) (Figura 10D), permitindo-nos inferir que essas aves apresentaram um nível reduzido de atenção ao ambiente, quando comparadas às codornas do grupo controle. Conforme reportado por Sain-Dizer et al. (2008), a alta frequência da exibição do comportamento de alta postura reflete uma reação emocional de aves à uma novidade ou a uma reação que caracteriza um estado de alerta frente a uma potencial ameaça. Por outro lado, a reduzida frequência de *freezing* das codornas que ingeriram água contendo abamectina (Figura 11D) sugere um efeito ansiolítico do pesticida, uma vez que estudos prévios, como o de Satterlee & Marin (2006), têm demonstrado que o aumento da exibição desse comportamento reflete diretamente um alto nível de estresse e ansiedade nesses animais. Logo, é tentador especular que os mecanismos de ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, considerada uma resposta adaptativa a um agente estressor, foi reduzida nas codornas expostas ao pesticida, levando-as a um comportamento compatível com um efeito ansiolítico, sem sedação.



**Figura 10.** (A) Latências para a locomoção; (B) total de cruzamentos, (C) frequência de exibição dos comportamentos de alta portura (D) e de *freezing* (D), de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* expostas ou não à abamectina. As barras representam a média + desvio padrão dos dados originais. Em “A e B” os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Em “C e D”, os dados foram submetidos ao one-way ANOVA, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. Controle: animais expostos apenas à água potável, sem abamectina; ABA1% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 15.5 mg a.i./L de abamectina; e “grupo ABA10% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 155.0 mg a.i./L de abamectina. n=10, por grupo experimental.

Em relação ao teste de reconhecimento de objeto, observamos interação entre os fatores “tratamento” e “tempo” para a frequência de exibição dos comportamentos de alta postura ( $F_{(3,53)} = 3,538$ ;  $p = 0,037$ ) e de *freezing* ( $F_{(3,53)} = 4,634$ ;  $p = 0,036$ ). Enquanto as codornas do grupo controle exibiram com mais frequências esses comportamentos quando o objeto foi introduzido na gaiola (demonstrando clara reação de alerta à novidade e possivelmente medo), as aves expostas ao pesticida não alteraram seus comportamentos na segunda sessão do teste (Figura 11A-B). Além disso, a frequência de alta postura e *freezing* das codornas não expostas à ABA, na segunda sessão do teste, foi significativamente maior, em relação aos demais grupos. Conforme reportado pioneiramente por Taylor et al. (1969) e Salzen et al. (1971), este teste permite avaliarmos se aves são capazes de reconhecer um objeto novo (de distintas cores), o que nos permite inferir sobre o nível de percepção do animal em relação ao ambiente; habilidade cognitiva, bem como sua emocionalidade (medo e ansiedade) (Forkman et al., 2007; Fernandes et al. 2015). Portanto, esses resultados reforçam a hipótese de que a abamectina tenha provocado um efeito ansiolítico nos animais (diminuindo sua reação à novidade e medo), assim como demonstrado no teste do campo

aberto. Por outro lado, não podemos negligenciar a possibilidade da ABA ter interferido negativamente na habilidade perceptiva do objeto colocado em um ambiente familiar, o que explicaria a ausência de respostas das codornas frente ao objeto novo.

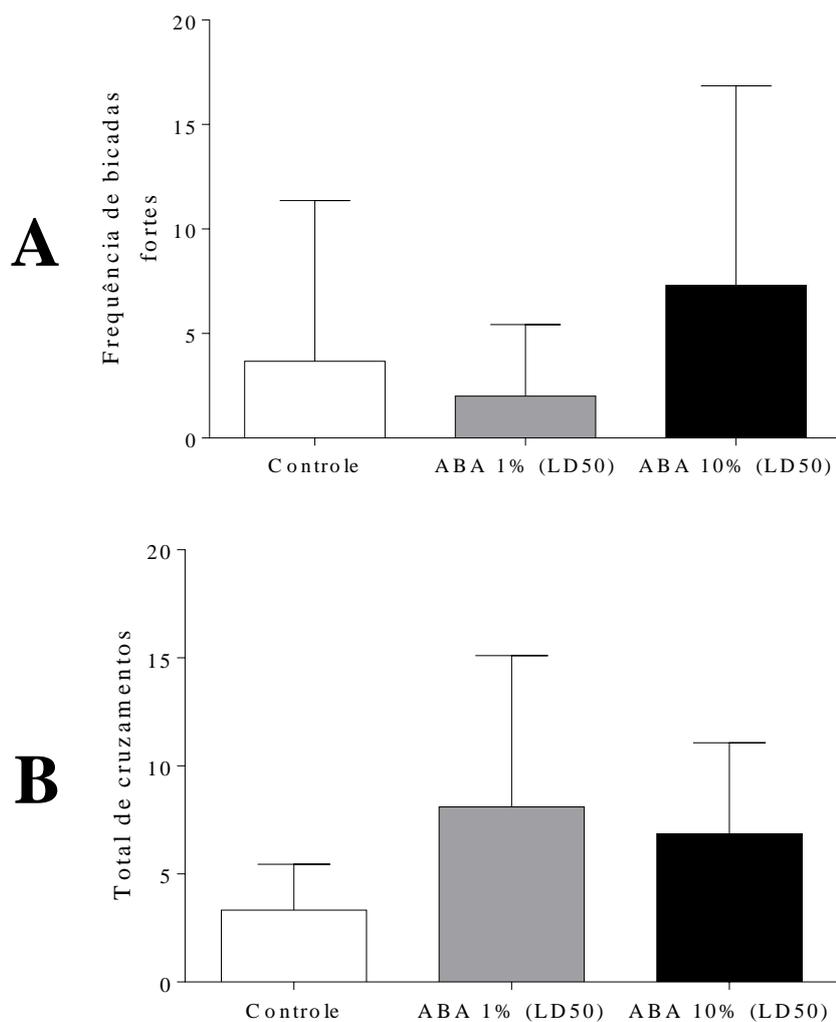


**Figura 11.** (A) Frequência de exibição dos comportamentos de alta postura e de (B) *freezing*, de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* (expostas ou não à abamectina) submetidas ao teste de reconhecimento de objetos. As barras representam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram transformados em log (x) para posterior ANOVA. Os dados foram submetidos ao two-way ANOVA, sendo que as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas. Controle: animais expostos apenas à água potável, sem abamectina; ABA1% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 15.5 mg a.i./L de abamectina; e “grupo ABA10% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 155.0 mg a.i./L de abamectina. n=10, por grupo experimental.

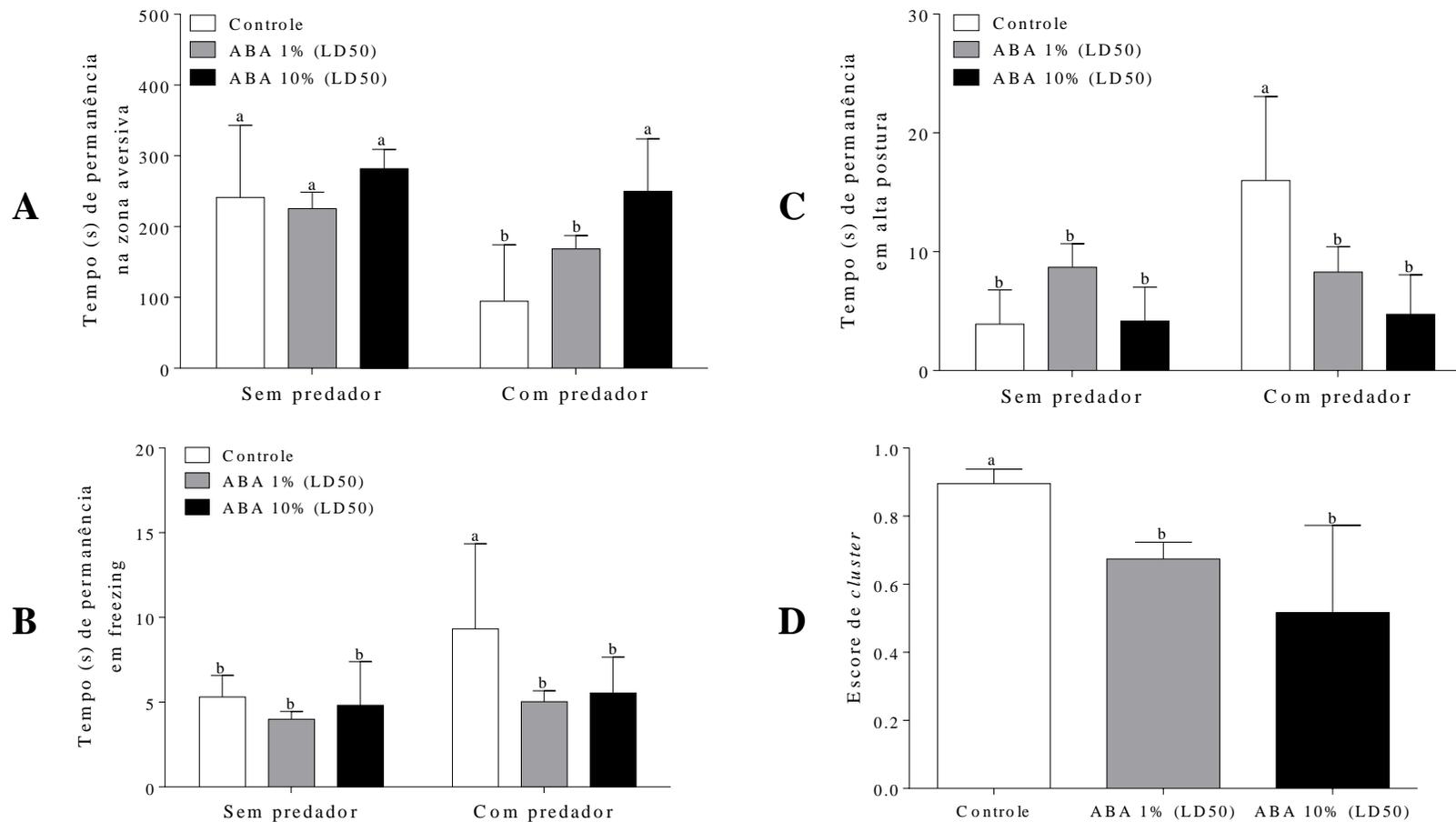
Em relação ao teste de agressividade, sabe-se que no ambiente natural o comportamento agonístico das aves está fortemente associada ao estabelecimento de uma hierarquia social, defesa de recursos e/ou da prole (Wingfield, 2005). Contudo, o aumento da agressividade constitui efeito negativo aos animais, uma vez que a baixa tolerância ao convívio social pode implicar em dificuldades reprodutivas e de interação social, o que pode tornar o indivíduo mais vulnerável a

potenciais predadores. Em nosso estudo não observamos efeito da exposição à ABA sobre a agressividade das codornas. Os grupos experimentais não diferiram entre si quanto à frequência de bicadas na divisória que separava a codorna teste de sua coespecífica não familiar ( $H = 2,858$ ;  $p = 0,239$ , Figura 12A), bem como quanto à ambulação ( $H = 4,183$ ;  $p = 0,123$ , Figura 12B), aferida por meio do total de cruzamentos dos quadrantes do aparato. Logo, esses dados sugerem que o pesticida não tenha influenciado a homeostase endócrina envolvendo hormônios que sabidamente podem aumentar a agressividade de fêmeas de *C. coturnix japonica*. Apesar do comportamento agressivo das fêmeas dessa espécie ter sido alvo de poucos estudos (em comparação aos machos) (Caliva et al., 2017), sabe-se que variações nas concentrações plasmáticas de esteroides (i.e.: progesterona, testosterona e estradiol) pode aumentar o comportamento agonísticos dessas aves (Brain et al., 1988; Schlinger et al., 1990). Nesse contexto, parece que a ingestão de água contendo ABA não causa alguma desregulação neuroendócrina relacionada à agressividade das aves avaliadas.

Por outro lado, a análise do comportamento defensivo das codornas no teste de resposta ao predador revelou interação entre os fatores “tratamento” e “estímulo” para todos os parâmetros avaliados. Observamos que as codornas expostas à ABA não responderam ao potencial predador, o que é evidenciado quando constatamos que o tempo de permanência na zona aversiva ( $F_{(2,50)} = 8,419$ ;  $p = 0,0007$ , Figura 13A) e de exibição dos comportamentos de alta postura ( $F_{(2,50)} = 8,248$ ;  $p = 0,0008$ , Figura 13B) e *freezing* ( $F_{(2,50)} = 5,436$ ;  $p = 0,007$ , Figura 13C) desses animais não diferiram entre as sessões com ou sem o predador. Já as codornas não expostas ao pesticida (grupo controle) diminuíram o tempo de permanência na zona mais próxima ao predador, além de terem aumentado a exibição dos comportamentos de alta postura e de *freezing*, sinalizando para o aumento do estado de vigilância e de estratégia defensiva, respectivamente. Além disso, as codornas expostas a ABA foram aquelas que receberam menor escore (de Cluster) no teste de agregação ( $H = 21,10$ ;  $p < 0,0001$ , Figura 13D). Assim, esse resultado demonstra que essas aves não foram capazes de perceber o som emitido por um gavião como uma possível ameaça, implicando, consequentemente em uma resposta defensiva prejudicada, uma vez que a agregação social dessas aves, além de aumentar a eficiência do forrageio, também constitui estratégia para minimizar a predação Carrascal et al. (1990).



**Figura 12.** (A) Frequência da exibição de comportamento de alta postura e (B) total de cruzamentos de *Coturnix coturnix japonica* expostas ou não à abamectina submetidas ao teste de agressividade. As barras representam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Controle: animais expostos apenas à água potável, sem abamectina; ABA1% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 15.5 mg a.i./L de abamectina; e “grupo ABA10% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 155.0 mg a.i./L de abamectina. n=10, por grupo experimental



**Figura 13.** (A) Tempos de permanência na zona aversiva, (B) de exibição dos comportamentos de alta postura e (C) de *freezing* de fêmeas de *Coturnix coturnix japonica* expostas ou não à abamectina submetidas ao teste de resposta ao predador. (D) Escores de *cluster* obtido no teste de agregação. As barras representam a média + desvio padrão dos dados originais. Em “A-C”, os dados foram previamente transformados em log (x) e posteriormente submetidos ao two-way ANOVA, sendo que as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Em “D”, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn’s, a 5% de probabilidade. Letras distintas indicam diferenças significativas. Controle: animais expostos apenas à água potável, sem abamectina; ABA1% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 15.5 mg a.i./L de abamectina; e “grupo ABA10% (DL<sub>50</sub>): animais expostos à água contendo 155.0 mg a.i./L de abamectina. n=10, por grupo experimental.

Logo, esses dados sugerem fortemente que o reconhecimento predatório, inato das aves (Curio, 1975), foi afetado pela exposição à ABA. Em mamíferos, diferentes estudos já demonstraram que a exposição desses animais a xenobióticos pode causar desregulação funcional do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), interferindo diretamente na produção de glicocorticoides (como o corticosterona) que são notadamente aumentados em roedores expostos a potenciais predadores (Anisman et al., 2001; Amaral et al., 2010). Em aves, isso não é diferente, uma vez que a homeostase endócrina envolvendo a síntese e liberação de corticosterona é crucial para sua resposta antipredatória (Grace et al., 2017). Apesar desses hormônios não regularem o comportamento dos animais, eles induzem mudanças químicas em conjuntos de neurônios específicos, tornando certos resultados comportamentais mais prováveis em certos contextos ambientais, fortalecendo ou enfraquecendo caminhos neurais particularmente importantes (Korte, 2001). Conforme discutido por Korte (2001), os corticosteroides constituem hormônios que atuam fornecendo adaptação fisiológica aos animais, facilitando o processamento de informações de ambientes ou situações potencialmente perigosas.

Em nosso estudo, os dados obtidos no teste de resposta ao predador (Figura 13A-C), de agregação social (Figura 13D), assim como aqueles obtidos no teste do campo aberto (Figura 10C-D), reforçam a hipótese de que alterações no eixo HPA tenham ocorrido, levando a um estado ansiolítico e de déficit responsivo sem, no entanto, causar efeito sedativo ou de hiperatividade. Nesse caso, arriscamos inferir que a ABA, mesmo em baixa concentração, possa ter agido como um desregulador endócrino, interferindo não apenas nos mecanismos neuronais que regulam a emocionalidade das aves, mas também naqueles que envolvem a produção e liberação de corticotropina, hormônio adrenocorticotrófico e suas ligações com receptores glicocorticoides, que potencializam ou atenuam as respostas defensivas dos animais (Korte, 2011; Sopinka et al., 2015). Além disso, não podemos negligenciar a possibilidade do pesticida ter agido ocasionando falhas nos mecanismos de retroalimentação negativa envolvendo a produção e liberação desses hormônios. Nesse sentido, estudos futuros serão importantes para avaliar, mais especificamente, as contribuições de cada efeito sobre o comportamento das aves expostas à ABA.

De qualquer forma, ponderamos que embora nossos dados permitam inferir sobre como a ABA afetou o comportamento das codornas avaliadas, é importante destacar que tem sido consenso que o comportamento defensivo das aves, assim como de outros grupos de vertebrados, é dependente de vários fatores que podem modular a exibição de categorias comportamentais antipredatórias, tais como: i) características do ambiente e da ameaça

(podendo variar de predador para predador); ii) distância entre a presa e seus potenciais predadores; iii) tipos e intensidade de estímulos predatórios oferecidos aos animais (visual, olfatório e/ou auditivo); iv) experiência prévia dos animais com o estímulo e com o ambiente e v) diferenças entre sexo, idade e linhagens dos animais avaliados (Kavaliers et al., 2001; Blanchard & Blanchard, 2003). Portanto, a avaliação das aves em outros contextos (ambientais e predatórios) pode ampliar o conhecimento acerca dos efeitos da ingestão de água contendo ABA sobre a biologia comportamental das aves.

Por fim, cabe-nos salientar que apesar de parâmetros comportamentais em testes de toxicidade sejam frequentemente recomendados como parte de uma avaliação mais abrangente, raramente são incluídos nos estudos envolvendo a exposição de aves a contaminantes (Quinn-Jr, 2012), o que explica a dificuldade de compararmos nosso estudo a outros previamente realizados. Considerando que o cérebro e outras partes do sistema nervoso central são muitas vezes mais sensíveis aos contaminantes do que outros sistemas somáticos, a exibição de mudanças comportamentais antes dos parâmetros tradicionalmente medidos (como reprodução e crescimento) pode ser útil para conhecermos o impacto sobre as aves. Assim, sugerimos fortemente que avaliações comportamentais sejam incorporadas em avaliações dos efeitos tóxicos de poluentes sobre a biologia das aves.

#### **4. CONCLUSÃO**

Em conclusão, nosso estudo confirma a hipótese de que a ingestão de água contendo ABA em concentrações subletais pode causar alterações nas respostas defensivas de fêmeas de *C. coturnix japonica* expostas a potenciais predadores. Dado o pioneirismo da nossa investigação, nossos resultados revelam apenas a “ponta do *iceberg*” que representa os prejuízos que a exposição à ABA pode ocasionar sobre a biologia comportamental das aves. Ao considerarmos que distúrbios no comportamento antipredatório podem impactar o fitness da presa e a dinâmica de suas populações, sugerimos que pesquisas futuras deem enfoque não apenas nos mecanismos biológicos que levaram às alterações observadas em nosso estudo, mas também sobre possíveis outros impactos que podem ocorrer nas aves que eventualmente venham a ingerir água contendo ABA. Esses estudos podem contribuir enormemente para que possamos compreender melhor a magnitude do impacto que esse agrotóxico pode ocasionar nos ecossistemas.

## 5. REFERÊNCIAS

- Albino LFT, Barreto SLT. Criação de codornas para produção de ovos e carne. Viçosa: Aprenda fácil. 289, 2003.
- Ardente AJ, Barlow BM, Burns P, Goldman R, Baynes RE . Vehicle effects on in vitro transdermal absorption of sevoflurane in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 25, 373-379, 2008.
- Bai SH, Ogbourne S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere* 154, 204-214, 2016.
- Brain PCOM, Onagbesan MJ, Peddie TGT. Changes in plasma concentrations of reproductive steroids in female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) raised on long or short photoperiods. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69,174–180, 1988.
- Caliva JM, Kembro JM, Pellegrini S, Guzman DA, Marin RH. Unexpected results when assessing underlying aggressiveness in Japanese quail using photocastrated stimulus birds. *Poultry Science*. 1-11, 2017.
- Casali-Pereira, MP, Daam, MA, de Resende, JC, Vasconcelos, AM, Espíndola, EL, & Botta, CM Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Chemosphere*. 139, 558-564, 2015
- Cheeseman J. Food Security in the Face of Salinity, Drought, Climate Change, and Population Growth. *Halophytes for Food Security in Dry Lands*. 111-123, 2016.
- Collins LM, Asher L, Pfeiffer DU, Browne W, Nicob C. Clustering and synchrony in laying hens: The effect of environmental resources on social dynamics. *Applied Animal Behaviour Science*. 129 43–53, 2011.
- Crisanto KO, Andrade WMG, Silva KDA, Lima RH, Costa MSMO, Cavalcante JS, Lima RRM, Nascimento ES, Cavalcante JC. The differential mice response to cat and snake odor. *Physiology & Behavior*. 152, 272–279, 2015.
- Curio E. The functional organisation of anti-predator behaviour in the pied flycatcher: a study of avian visual perception. *Anim. Behav.* 23, 1-115, 1975.
- Damalas CA, Muhammad K. "Farmers" attitudes towards pesticide labels: implications for personal and environmental safety. *International Journal of Pest Management* 62, 319-325, 2016.
- Fernandes, DPB, Silva, IJO, Nazareno, AC, Donofre, AC, Sevegnani, KB. Reconhecimento de cores de objetos e de alimentos de cromaticidades opostas por pinto de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 67,873-881, 2015.
- Forkman B, Boissy A, Meunier-Salaün MC, Canali E, Jones RB. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol Behav.* 92, 340-74, 2007.

- Formanek L, Houdelier C, Lumineau S, Bertin A, Cabanès G, Richard-Yris MA. Selection of social traits in juvenile Japanese quail affects adult's behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*. 112: 174-186, 2008.
- Geng B, Lingling Z, Yun J. Genotoxicity of Three Avermectins on Polypedates megacephalus Tadpoles Using the Comet Assay. *Asian Herpetological Research (AHR)*. 251-257, 2016.
- Grace JK, Martin-Gousset L, Angelier F. Delayed effect of early-life corticosterone treatment on adult anti-predator behavior in a common passerine. *Physiology & Behavior*, 177, 82-90, 2017.
- Grue CE, Shipley BK . Sensitivity of nestling and adult starlings to dicotophos, an organophosphate pesticide. *Environmental research*. 454-465, 1984.
- Hussain R, Khan A, Mahmood F, Rehan S, Ali F, Ahrar K, Fazal M, Sarmad RFA. Clinico-hematological and tissue changes induced by butachlor in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 109, 58–63, 2014.
- Jardim Filho RM. Níveis dietéticos de lisina digestível para poedeiras comerciais nas fases de pré-postura e postura Tese (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.110, 2006.
- Lankas. GR, Gordon LR. Toxicology. In: Campbell WC (Ed.). Ivermectin and Abamectin. Springer- Verlag. NY,1989.
- Li W, Wei-Wei S, Guo-Hua D, Xiao-Li F, Miao-Ling Y, Zhi-Hua L. Acute and joint toxicity of three agrochemicals to Chinese tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles. *Zoological Research*. 272, 2014.
- Lu Y, Song S, Wang R, Liu Z, Meng J, Sweetman AJ, Wang T. Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environment international*. 77, 5-15, 2015.
- Lumaret JP, Errouissi F, Floate K, Rombke J, Wardhaugh K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current pharmaceutical biotechnology*.1004-1060, 2012.
- MAPA. Registro de produtos agrícolas ( Kraft 36®EC). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/registro-de-estabelecimentos-e-produtos>. Acesso em: 14 mai.de 2017.
- Mendes, LB. Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE em Danio rerio (*Cypriniformes, Cyprinidae*) por meio de estudos experimentais. Diss. Universidade de São Paulo, 2011.
- Michael J, Quinn Jr. Avian behavioral toxicity methods for use with the Japanese Quail *Coturnix japonica* as a model species. *Avian Ecol. Behav*. 21, 41–50, 2012.

- Mills AD, Crawford LL, Domjan M, Faure JM. The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 261-281, 1997.
- Novelli A, Vieira BH, Vasconcelos AM, Peret AC, Espíndola EL. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 87-93, 2012.
- Novelli A, Vieira BH, Cordeiro D, Cappelini LTD, Vieira EM, Espíndola ELG. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere*. 86, 36-40, 2012
- Novelli A, Vieira BH, Braun AS, Mendes LB, Daam MA, Espíndola ELG. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. *Chemosphere*. 144, 1408-1414, 2016.
- Oliveira BM, Rabelo LM, Silva BC, Souza JM, Castro ALS, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia G. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 19234-19248, 2017.
- Parker MO, Annan LV, Kaneellopoulos AH, Brock AJ, Baiamonte MB, The MT, Brennan CH. The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 19234-19248, 2017.
- Red List. *International Union for Conservation of Nature (IUCN)*. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/photos/2016>. Acesso em 24 de mar.de 2017.
- Rivera - Becerril F, Van Tuinen D, Chatagnier O, Rouard N, Béguet J, Kuszala C, Martin-Laurent Impact of a pesticide cocktail (fenhexamid, folpel, deltamethrin) on the abundance of lomeromycota in two agricultural soils. *Science of The Total Environment*. 577, 84-93, 2017.
- Romijn CAFM, Grau R, Guth JA, Harrison EG, Jackson CM, Lefebvre B, Street JR. The use of Japanese and bobwhite quail as indicator species in avian toxicity test. *Chemosphere*. 30, 1033-1040, 1995.
- Roper TJ, Marples NM. Colour preferences of domestic chicks in relation to food and water presentation. *Appl. Anim. Behav.* 54, 207-213, 1997.
- Ross SM, McManus IC, Harrison V, Mason O. Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. *Critical reviews in toxicology*. 43, 21-44, 2013.
- Salzen EA, Lily RE, Mckeown JR. Colour preference and imprinting in domestic chicks. *Anim. Behav.* 19,542-547, 1971.

Santos WM, Rosado FR. Dados preliminares da biologia do Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*, Gmelin, 1788) na Região noroeste do Paraná . Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. 2, 421-430, 2009.

Satterlee DG, Marin RH. Stressor-induced changes in open-field behavior of Japanese quail selected for contrasting adrenocortical responsiveness to immobilization. Poult Sci. 85, 404-9, 2006.

Schlinger BA, Callard G. Aggressive behavior in birds: an experimental model for studies of brain-steroid interactions. Comp Biochem Physiol. 97A, 307-316, 1990.

Schlinger BA, Callard GV. Aromatase activity in quail brain: correlation with aggressiveness. *Endocrinology*. 124, 437-443, 1989.

Sopinka NM, Patterson LD, Redfern JC, Plezner NK, Belanger CB, Midwood JD, Crossin GT, Cooke SJ. Manipulating glucocorticoids in wild animals: basic and applied perspectives. *Conservation Physiology*. 3-31, 2015.

Souza JM, Guimarães ATB, Silva WAM, Pereira CCO, Menezes IP, Malafaia G. Tannery effluent effects on vertebrates: lessons from experimental animals. *International Journal of Current Research*, 8, 39902 - 39914, 2016.

Taylor A, Sluckin W, Hewitt R. Changing colour preferences of chicks. *Anim. Behav.* 17, 3-8, 1969.

Thanomsit C. Evaluation of abamectin effect on some biochemical constituents and histological alterations in Asian sea bass (*Lateolabrax niloticus*). Naresuan university Journal: Science and Technology. 24, 72-8, 2016.

Thanomsit C, Wattanakornsiri A, Nanthanawat P. Adverse Effects of Abamectin on Hematological Profile and Histological Alterations of Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*). *Burapha science journal*. 22, 2, 2017.

Tisler T, Kozuh EN. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*. 15, 495-502, 2006.

Vandermaesen J, Horemans B, Bers K, Vandermeeren P, Herrmann S, Sekhar A, Springael D. Application of biodegradation in mitigating and remediating pesticide contamination of freshwater resources: state of the art and challenges for optimization. *Applied microbiology and biotechnology*. 100, 7361-7376, 2016.

Vasconcelos AM, Daam MA, dos Santos LR, Sanches, AL, Araújo CV, Espíndola EL. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. *Ecotoxicology*. 25, 500-509, 2016.

Webb R, Buratini, J. Global Challenges for the 21st Century: the Role and Strategy of the Agri-Food Sector. *Anim. Reprod.* 13, 133-142, 2016.

Wingfield JC. Historical contributions of research on birds to behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav.* 48, 395-402, 2005.

Wislocki PG, Grosso LS, Dybas RA. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In *Ivermectin and abamectina*. 182-200, 1989.

### ANALYSIS OF VARIOUS EFFECTS OF ABAMECTIN ON ERYTHROCYTE MORPHOLOGY IN JAPANESE QUAILS (*Coturnix coturnix japonica*)

#### ABSTRACT

Although previous studies have already confirmed the toxicological potential of abamectin (ABA) in different experimental models (from invertebrates to vertebrates), almost nothing is known about the impacts the exposure to this pesticide can cause on birds. Thus, the aim of our study is to investigate the cytotoxic effects on the erythrocytes of female Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) exposed to low abamectin concentrations. In order to do so, three experimental groups were proposed: “control”, composed of quails exposed to abamectin-free drinking water; “ABA 1% median lethal dose (LD<sub>50</sub>)”, comprising birds exposed to water containing 15.5 mg a.i./L of abamectin (via commercial formulation Kraft® 36EC), and “ABA 10% LD<sub>50</sub>”, composed by birds exposed to water containing 155.0 mg a.i./L of abamectin. The micronucleus test and the tests applied to other nuclear abnormalities in the peripheral blood of birds were conducted 40 days after exposure. Our study revealed significant physical abnormalities in nuclear shapes (erythrocytes with asymmetric constriction nuclei, notched nuclei, indented and moved nucleus) of those birds exposed to higher abamectin levels. When all nuclear abnormalities were tallied, a significant dose dependent trend was noted. Therefore, our study presents initial imprints on determination of abamectin mediated cellular toxicity in avifauna which can be instrumental in checking polluted ecosystems.

**Keywords:** Birds, pesticide, erythrocyte morphology, aquatic pollution.

## 1. INTRODUCTION

It is known that the broad use of pesticides in agricultural production processes have been harming and causing changes in the environment, either through the combination of biotic communities that compose them, or through the accumulation of chemical components potentially toxic to ecosystems abiotic segments (Carvalho, 2017). The concern about the possible effects of agrochemicals on the biota is increasing, mainly when one takes into account that most of these products can reach non-target organisms. Runoff losses often happen, and concentrations can reach different ecosystems; such scenario exposes non-target organisms to the applied pesticides, although the routes that different pesticides take in the environment depend on their physical and chemical characteristics, as well as on the environment itself (Gavrilescu, 2005). Besides, the application of pesticides close to riverbeds, as well as the inappropriate discharge of their packages, are relevant factors impairing the dissipation of these products in the environment.

Abamectin is one of the largely used pesticides in different agricultural crops such as cotton, maize, potatoes, coffee, citrus, beans, tomatoes, among others. This pesticide can reach the water surface through surface leak on the spoil, and harm non-targets who live in aquatic ecosystems or in ecosystems that live on their water. Abamectin, also known as Kraft<sup>®</sup> 36EC, belongs to the chemical group of avermectins (Fisher & Mrozik, 1989), which represents a class of macrocyclic lactones showing nematicide, acaricide and insecticide activity (Lasota & Dybas, 1991). Abamectin is the only composite of this family, which was used either to protect cultures or for pharmaceutical purposes; it is composed of avermectin B<sub>1a</sub> (at least 80%) and avermectin B<sub>1b</sub> (no more than 20%) mixture. Both homologues, B<sub>1a</sub> and B<sub>1b</sub>, are quite similar regarding biological and toxicological properties, and they form a composite of high molar mass (Lankas & Gordon, 1989; Campbell, 1989; Fisher & Mrozik, 1992).

It is known that the antiparasitic activity of abamectin results from its capacity to cross the blood-brain barrier and act in the nervous system of invertebrates, thus causing paralysis in nematodes and arthropods (Abongwa et al., 2017). According to Hüter (2011), avermectins are classified as neurotoxins that act through glutamate and/or through  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA)-gated chloride channel. However, the glutamate-gated chloride (GluCl) channels are assumed to be the primary target of avermectins in invertebrates such as nematodes and arthropods, besides being vital to control invertebrate's functions (Wolstenholme, 2012).

On the other hand, previous studies have already shown the toxic effects resulting from vertebrates' exposure to abamectin. These effects are relevant for the knowledge about how this pesticide affects fish (Noveli et al., 2012; Thanomsit et al. 2017), amphibians (Wei et al., 2014; Vasconcelos et al., 2016) and mammals (El-Shafey et al., 2011; Maioli et al., 2013; Nasr et al., 2016). However, when it comes to birds, there is only one known study, which was conducted by Lankas & Gordon (1989), who investigated acute toxicity of exposure to abamectin in *Colinus virginianus* and *Anas platyrhynchos*. Such investigation was important to set the pesticide's lethality to these birds, when it is found in the feed provided to the birds at median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of 3,120.00 mg/kg. Nevertheless, the authors did not assess the aspects beyond the lethality to these experimental models. Thus, it is possible noticing that studies about the effects of birds' exposure to abamectin are scarce, and it reinforces the need of conducting new investigations in order to better understand the magnitude of effects from water contamination by this pesticide and the consequences of its intake by representatives belonging to the avian class.

Assessing the cytotoxicity caused by the exposure of birds to different contaminants is a research field able to help understanding the herein addressed effects. Among the cytotoxic assays, the micronucleus test and the assessment of other nuclear abnormalities have been broadly used to assess the cytogenetic damages induced by chemical and physical agents due to their simplicity and sensitivity to xenobiotics able to induce DNA alterations (MacGregor et al., 1990). Many studies focused on birds' exposure to contaminants already showed the usefulness of techniques able to identify toxic effects, as well as to bio-monitor the environment (Skarphedinsdottir et al., 2010; Hussain et al., 2012; Hussain et al. 2014; Baesse et al., 2015; Alimba & Bakare, 2016; Souza et al., 2017). According to Souza et al. (2017), the consequences from erythrocyte nuclear alterations in birds, for instance, include the straight impact on the individuals' survival, on breeding and even on the genetic heritage of species exposed to this contaminant via mutation induction.

Thus, the aim of our study was to investigate the cytogenetic effects on the erythrocytes of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) exposed to sub-lethal pesticide concentrations. The initial hypothesis was that birds' exposure to water containing abamectin can cause cytogenetic damage to them. Our study helps broadening the knowledge about the toxic effects of this pesticide on a vertebrate group, which was little studied so far, if we take into account that cultivated areas can receive abamectin as bio-pesticide and that surface

water leak in these areas, due to rainfall, can contaminate the natural water courses that work as water source to birds.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Experimental model**

Female quails belonging to species *Coturnix coturnix japonica* were used in the conduction of our study. All birds were acquired from a commercial breeder (Pires do Rio, GO, Brazil) and, after the equitable division of body mass, quails were distributed in six stainless steel cages (37.5 cm long, 34 cm wide, 22 cm high); five birds were placed in each cage (27 cm<sup>2</sup>/bird). Next, the birds were kept in experimental room under controlled temperature (24°C to 25°C) and light (12-h light cycle), according to Hussain et al. (2014). Moreover, quails were fed with commercial feed *ad libitum*, according to recommendations by Silva & Costa (2009). The drinking fountains made available to the birds were of “*chiristino*” type, and feed was provided in galvanized-sheet type feeder.

### **2.2. Experimental design**

The total of 32 birds in the age group 35 to 40 days, was distributed in three experimental groups: i) “control group” (n=10), birds received only drinking water (without abamectin); ii) “ABA 1% (DL<sub>50</sub>) group” (n=10), birds received 1% of the median abamectin lethal dose (DL<sub>50</sub>) (31.02 mg/L of the commercial formulation Kraft<sup>®</sup> 36 EC = 15.5 mg a.i./L of abamectin) identified in a previous study (Lankas & Gordon 1989); and “ABA 10% (DL<sub>50</sub>) group” (n=10), birds received 10% of the referred DL<sub>50</sub> (310.2 mg/L of Kraft<sup>®</sup> 36 EC = 155.0 a.i./L of abamectin).

Kraft<sup>®</sup> 36 EC (Bayer Crop Science Ltda., Belford Roxo – RJ, Brazil) was the commercial product used in the present study, it is classified as acaricide, insecticide and nematicide. Kraft<sup>®</sup> 36 EC is one of the used pesticides in Brazil due to its efficacy to control plagues; it is registered at *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)* – Ministry of Agriculture, Livestock and Supply – under n. 7703 for use in 23 different crops such as beans, tomatoes and potatoes (MAPA, 2013). Moreover, according to MAPA, the toxicological classification attributed to Kraft 36 EC<sup>®</sup> is class I, i.e., it is extremely toxic, besides highly persistent and very dangerous to the environment and to the biota (MAPA, 2013).

All concentrations defined in the present study were considered as nominal values. In order to confirm the abamectin nominal concentrations at 15.5 mg a.i./L and 155.0 mg a.i./L, it was analyzed through HPLC/MS/MS. Analyses were conducted by means of HPLC/MS/MS Agilent1 6490 series attached to the Zorbax Eclipse plus C18 Agilent column (water mobile phase: acetonitrile = 10:90 v/v). They showed that the intended test concentrations were  $97.8 \pm 4.7$  of the nominal value (mean  $\pm$  SD; n = 8).

## **2.3. Evaluations**

### **2.3.1. Water intake and clinical evaluation**

The consumption of liquids was daily measured in order to verify whether abamectin exposure caused distaste to contaminated water and possible dehydration in the birds. Measurements were done by daily subtracting the waste from the day before from the actual total amount first offered. Besides, birds were daily monitored and assessed throughout the experimental period in order to check the following clinical toxicity signs: i) weakness, falling off the perch, incapacity to walk, stand or fly straight; ii) lethargy; iii) shallow breathing; iv) diarrhea; v) cyanosis; vi) regurgitation/vomiting; vii) feather picking; viii) pale mucous membranes; ix) shivering melena; x) ataxia; xi) head tilt; xii) seizures; and xiii) blindness.

The Relative Weight Index (RWI) of each bird was calculated at the end of the experiment as a way to assess whether the environmental disturbance caused by abamectin would have impact on the birds' body composition. The RWI was calculated according to Schulte-Hostedde et al. (2005) and Souza et al. (2017), as follows: measuring the right tarsus (mm)/biomass (g), and the relative liver, heart, infundibulum, uterus, brain, ovary and isthmus weights. In order to do so, the mass of the organs was normalized to body weight using the following formula: mass of the organs (g) /body weight (g).

### **2.3.2. Micronuclei and nuclear changes**

For evaluation of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes blood smears were prepared on clean slides (two slides per bird), fixed (using 100 percent (v/v) cold methanol for 5 min), stained with Panótico Rápido® (New Prov) and, then, analyzed under optical microscope (Olympus) using immersion lens. Coded and randomized slides were blind-scored by a single observer. It was predicted that the MN frequency would be set according to the examination criteria previously reported by Souza et al. (2017). The presence of other ENA was assessed according to procedures by Lajmanovich et al. (2014) and Souza

et al. (2017), using mature erythrocytes to set the frequency of the following nuclear lesions. A total of 4000 erythrocytes/bird/smear was examined.

#### 2.4. Data analysis

Shapiro-Wilk normality test was initially used to assess data distribution; next, body mass data were subjected to analysis of factorial variance (*two-way* ANOVA) (2 x 3) by taking into account the following factors: “time” (two levels: beginning and end) and “treatment” (control, ABA 1% DL<sub>50</sub> and ABA 10% DL<sub>50</sub> groups). The other data were subjected to analysis of variance (*one-way* ANOVA) followed by Tukey test in cases of significant F. When data did not present normal distribution, they were transformed into log scale for further ANOVA. Significance value 5% was adopted to all analyses. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism software version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

### 3. RESULTS

Birds exposed to the intake of water contaminated with abamectin throughout the experimental period did not present any sign of clinical toxicity. Moreover, we observed that either during the experimental period, or at the end of it, the clinical examination applied to the birds did not evidence signs or symptoms related to dehydration. Such result puts aside the possibility that birds could consume less liquids due to distaste to contaminated water. Therefore, there was no statistical difference in the mean water intake between groups ( $F_{(2,52)} = 1.307$ ;  $p = 0.279$ ) (see Supplementary material online, Figure 1).

On the other hand, the physical examination applied to the birds showed body mass gain in birds belonging to all groups when this variable was compared to the initial and final masses (Figure 2). Such result was already expected, if one considers bird growth/development throughout the exposure period, since the experiment started when the birds were still in the juvenile period. Therefore, the statistical analyses only showed the effect of factor “time” ( $F_{(2,52)} = 63.50$ ;  $p < 0.0001$ ) on the biomass parameter. However, we did not observe any difference among the relative mass of the liver ( $F_{(2,27)} = 0.626$ ;  $p = 0.542$ ), heart ( $F_{(2,27)} = 3.212$ ;  $p = 0.060$ ), infundibulum ( $F_{(2,27)} = 0.483$ ;  $p = 0.622$ ), uterus ( $F_{(2,27)} = 1.599$ ;  $p = 0.221$ ), brain ( $F_{(2,27)} = 0.474$ ;  $p = 0.627$ ) and of the isthmus ( $F_{(2,27)} = 0.860$ ;  $p = 0.435$ ) (Figure 3A) of the experimental groups. Besides, there were no statistically significant

differences between the calculated RWI of birds belonging to different groups ( $F_{(2,52)} = 0.485$ ;  $p = 0.621$ ) (Figure 3B). Thus, it is possible saying that the assessed treatments did not affect the somatic indices of the analyzed birds, as well as that the used pesticide was not capable of causing typical signs of systemic toxicity in the birds.

**<Insert Figure 2 and 3>**

On the other hand, although we did not find micronuclei in the erythrocyte cells from birds in any of the experimental groups, birds exposed to the pesticide presented larger amounts of erythrocytes with other nuclear alterations such as asymmetric constriction (Figure 4A), binucleated erythrocytes, notched nuclei (Figure 4B), and indented and moved nucleus (Figure 4C). Besides, when all the nuclear abnormalities identified in the birds' erythrocytes were summed, we observed a dose-response effect, i.e., the higher the abamectin concentration in the water, the higher the frequency of nuclear alterations (Figure 4D). Figure 5 depicts the erythrocyte representations and the morphology of their nuclei observed in the current study.

**<Insert Figure 4 and 5>**

#### **4. DISCUSSION**

These data point towards a cytotoxic effect never reported in the literature about birds exposed to abamectin. The only investigation about the exposure of representatives of the avian class (*Colinus virginianus* and *Anas platyrhynchos*) to abamectin found lethal impact on the assessed birds (*Colinus virginianus* and *Anas platyrhynchos*); however, it did not report any sub-lethal biological alteration, not even changes in birds' bodies able to explain the recorded mortality rates. In any case, our findings reinforce previous studies that point out strong association between high nuclear abnormality rates in peripheral blood erythrocytes and environmental alterations in different experimental models such as fish (Lopez-González et al., 2017), amphibians (Montalvão et al., 2017; Pollo et al., 2017) and reptiles (Schaumburg et al., 2016).

These abnormalities in birds have been associated with the presence of different contaminants in the body. Hussain et al. (2012) exposed *C. coturnix japonica* to the herbicide atrazine and Alimba et al. (2016) exposed quails to the intake of water containing sanitary landfill slurry. Besides, erythrocyte nuclear abnormalities were reported in studies involving broiler exposed to cypermethrin (pyrethroid insecticide) (Sharaf et al., 2010), to monocrotophos (organophosphorus insecticide) and to lindane (organochlorine insecticide)

(Bhunya & Jena 1993); and female and male Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to the intake of water contaminated with tannery effluent (Souza et al., 2017).

Despite the compelling evidence of the cytotoxic potential of different pollutants to birds' peripheral erythrocytes, there is no consensus about the action mechanisms of these contaminants in the genetic material (Torres-Bugarin et al., 2014). However, by taking into account the most frequent nuclear abnormalities recorded for the herein investigated birds, it is tempting to speculate that abamectin have affected the late stages of erythrocyte cell division, thus harming the cytokinesis process (inferred through the presence of binucleated cells – Figure 4B). Moreover, according to Gómez-Meda et al. (2006), the largest number of nuclei with asymmetric constriction such as notched, indented and moved nuclei (Figures 4A-3C) in birds exposed to abamectin can be related to increased Caspase-Activated DNase (CAD) production and release. Such fact leads to the cleavage of different nuclear and cytoskeleton proteins, to mitochondrial damage, to DNA protein nitration, to tubulin polymerization failure or to rRNA oxidation.

The increased frequency of erythrocytes with moved nuclei in birds exposed to abamectin (Figure 4C and Figure 4.B5) reinforces the hypothesis of damage in structures/proteins that keep the nuclei in central position such as the elements of the cytoskeleton; it would have allowed the twist/displacement of erythrocyte nuclei. On the other hand, it is intriguing that we did not identify micronuclei in the erythrocytes of the herein assessed birds. Mainly in the ones exposed to the pesticide, since micronuclei could have originated from biological alterations able to cause other nuclear abnormalities such as clastogenic (induced by double-chain breaks) and aneuploidogenic events (induced by poor chromosomal segregation) (Iarmarcovai et al., 2008). Accordingly, new investigations are recommended in order to actually better understand the mechanisms responsible for the herein observed nuclear alterations. The establishment of groups of birds exposed to drugs of known mutagenic effect may really help understanding these mechanisms.

In any case, the increased frequency of nuclear alterations in avian erythrocytes may imply damaging consequences to individuals and even to populations as a whole (Souza et al., 2017). According to Hussain et al. (2015), nuclear and morphological changes in avian erythrocytes make them more susceptible to burst when crossing small capillaries. Moreover, such result could be also elated to increased process of erythropoiesis in order to eliminate damaged cells and to balance the impaired function. Therefore, it is possible stating that the accumulation of DNA damages can be an important event able to influence the survival,

breeding and perpetuation of avian species, because it makes them more susceptible to environmental variations.

## 5. CONCLUSION

Our data confirmed our initial hypothesis about the cytotoxic potential of abamectin, thus they evidenced that female *C. coturnix japonica* exposed to water contaminated with this pesticide (at sub-lethal concentrations) present higher frequency of erythrocyte nuclear abnormalities. Accordingly, our study opens windows for new investigations to be performed in order to help better understanding the magnitude of impacts caused by this pesticide on representatives of the avian class. Moreover, our data show that variations in the shape of avian circulating erythrocyte nuclei may provide an important/complementary approach to detect cytotoxicity caused by the intake of water contaminated with pesticides.

## 6. ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Research (CNPq) (Brazilian research agency) (Proc. No 467801/2014-2) and *Instituto Federal Goiano* for the financial support. Moreover, the authors are grateful to the CNPq for supporting scholarship to the student who developed this study.

## 7. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

**Funding:** This study was funded by Brazilian National Council for Research (CNPq) (Brazilian research agency) (Proc. No 467801/2014-2) and *Instituto Federal Goiano* – Campus Urutaí (GO, Brazil)

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval:** All the procedures were approved by The Ethics Committee on Animal Use of Goiano Federal Institute (Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano), GO, Brazil (protocol No. 7257130516). Meticulous efforts were made to assure that the animals suffered the least possible and to reduce external sources of stress, pain and discomfort. The current study did not exceed the number of animals necessary to produce trustworthy scientific data. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

## 8. REFERENCES

- Abongwa M, Martin RJ, Robertson (2017). A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria* 67: 137-152.
- Alimba CG, Bakare AA 2016 In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. *Ecotoxicology* 25: 310-319.
- Baesse CQ, Tolentino VCM, Silva AM, Silva AA, Ferreira GA, Paniago LPM, Nepomuceno JC, Melo C (2015) Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115: 223-228.
- Bhunya SP, Jena GB (1993) Studies on the genotoxicity of monocrotophos, an organophosphate insecticide, in the chick in vivo test system. *Mutat Res* 292: 231-239.
- Campbell WC (1989) Ivermectin and Abamectin. New York: NY, Springer Verlag.
- Carvalho FP (2017) Pesticide, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6: 48-60.
- El-Shafey AAM, Seliem MME, El-Mahrouky F, Gabr WM, Kandil RA (2011) Some physiological and biochemical effects of oshar extract and abamectin biocide on male albino rats. *J Am Sci* 7:254–261, 2011.
- Fisher MH, Mrozik H (1989) Chemistry. In: Campbell WC (ed), Ivermectin and Abamectin. New York: NY, Springer Verlag.
- Fisher MH, Mrozik H (1992) The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32: 37-53.
- Gavrilescu M (2005) Fate of pesticide in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5: 497-526.
- Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Luna-Auirre J, González-Rodríguez A, Ramos-Ibarra L, Torres-Bugarín O, Batista-González CM, Zúñiga-González GM (2006) Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathology* 35: 206-210.
- Hussain AG, Khan A, Abbas RZ, Asad M (2015) Clinico-hematological and mutagenic changes induced by arsenic and copper sulphate in adult poultry males. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 25: 1555-1561.
- Hussain R, Khan A, Mahmood F, Rehan S, Ali F (2014) Clinico-hematological and tissue changes induced by butachlor in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pestic Biochem Physiol* 109: 58-63.

- Hussain R, Mahmood F, Khan A, Javed MT, Rehan S, Mehdi T (2012) Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pestic Biochem Physiol* 103:38–42.
- Hüter O (2011) Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem Revs* 10: 185-194.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* 658: 215-253.
- Lajmanovich RC, Cabagna-Zenklusen MC, Attademo AM, Junges CM, Peltzer PM, Bassó A, Lorenzatti E (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 769: 7-12.
- Lankas GR, Gordon LR (1989) Toxicology, p.89-112. In: Campbell W.C. (ed.) Ivermectin and Abamectin. New York: Springer Verlag.
- Lasota JA, Dybas RA (1991) Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. *Annu Rev Entomol* 36: 91-117.
- MacGregor JT, Wehr CM, Henika PR, Shelby MD (1990) The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14: 513-522.
- Maioli MA, Medeiros HCD, Guelfi M, Trinca V, Pereira FTV, Mingatto FE (2013) The role of mitochondria and biotransformation in abamectin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro* 27: 570-579.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Brazil. (2017) Consulta de ingrediente ativo. Available in: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Access in: 9 Nov., 2017.
- Montalvão MF, Souza JM, Guimarães ATB, Menezes IPP, Castro ALS, Rodrigues ASL, Malafaia G (2017) The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere* 183: 491-502.
- Nars HM, El-Demerdash FM, El-Nagar WA (2016) Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats. *Environ Sci Pollut Res* 23: 1852-1859.
- Novelli A, Vieira BH, Cordeiro D, Cappelini LT, Vieira EM, Espíndola EL (2012) Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere* 86: 36-40.

- Pollo FE, Grenat PR, Salinas ZA, Otero MA, Salas NE, Martino AL (2017) Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 18179-18187.
- Schaumburg LG, Siroski PA, Poletta GL, Mudry MD (2016) Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 130: 71-78.
- Schulte-Hostedde AI, Zinner B, Millar JS, Hickling GJ (2005) Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86: 155-163.
- Sharaf S, Khan A, Khan MZ, Aslam F, Saleemi MK, Mahmood F (2010) Clinico-hematological and micronuclear changes induced by cypermethrin in broiler chicks: Their attenuation with vitamin E and selenium. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62: 333-341.
- Skarphedinsdottir H, Hallgrímsson GT, Hansson T, Hägerroth PA, Liewenborg B, Tjärnlund U, Akerman G, Barsiene J, Balk L (2010) Genotoxicity in herring gulls (*Larus argentatus*) in Sweden and Iceland. *Mutat Res* 702:24-31.
- Souza JM, Montalvão MF, da Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia G (2017) A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere* 175: 521-533.
- Thanomsit C, Wattanakornsiri A, Nanthanawat P (2017) Adverse effects of abamectin on hematological profile and histological alterations of hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*). *Burapha Science Journal*, 22: 169-182.
- Torres-Bugarin O, Zavala-Cerna MG, Nava A, Flores- Garcia A, Ramos-Ibarra ML (2014). Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers* 2014: 956835.
- Vasconcelos AM, Daam MA, Santos LRA, Sanches ALM, Araújo CVM, Espíndola ELG (2016) Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. *Ecotoxicology* 25: 500-509.
- Wei L, Shao WW, Ding GH, Fan XL, Yu ML, Lin ZH (2014) Acute and joint toxicity of three agrochemicals to Chinese tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles. *Dongwuxue Yanjiu* 35: 272-279.
- Wolstenholme AJ (2012) Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem* 287: 40232-40238.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Average daily water consumption (mL) of female *C. coturnix japonica* exposed, or not, to water containing abamectin. Bars indicate the mean + standard deviation of the collected data. The data were analyzed through the of variance (one-way ANOVA), at 5% probability. “Control group”: animals exposed to pure drinking water, without abamectin; “ABA 1% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 15.5 mg a.i./L of abamectin; and “ABA 10% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 155.0 mg a.i./L of abamectin. n=10, per experimental group.

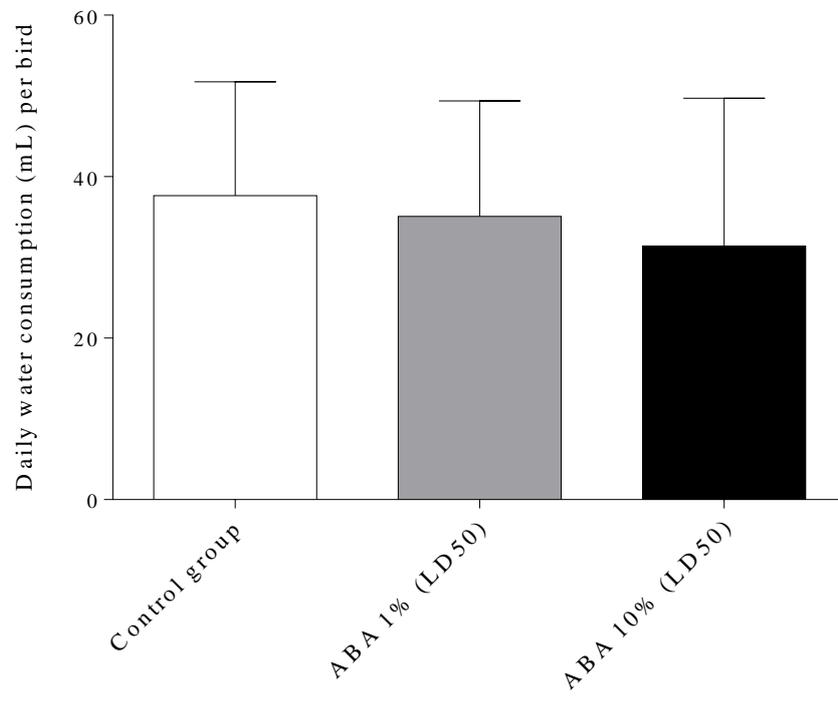
**Figure 2.** Initial and final biomass of female *C. coturnix japonica* exposed, or not, to water contaminated with abamectin. Bars indicate the mean + standard deviation of the collected data. Different lower case letters indicate statistically significant differences in the analysis of factorial variance (two-way ANOVA), at 5% probability. “Control group”: animals exposed to pure drinking water, without abamectin; “ABA 1% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 15.5 mg a.i./L of abamectin; and “ABA 10% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 155.0 mg a.i./L of abamectin. n=10, per experimental group.

**Figure 3.** (A) Relative biomass of different organs and (B) Relative Weight Index of female *Coturnix coturnix japonica* exposed, or not, to water contaminated with abamectin. Bars indicate the mean + standard deviation of the data. Data were subjected to analysis of variance (one-way ANOVA), at 5% probability. “Control group”: animals exposed to pure drinking water, without abamectin; “ABA 1% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 15.5 mg a.i./L of abamectin; and “ABA 10% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 155.0 mg a.i./L of abamectin. n=10, per experimental group.

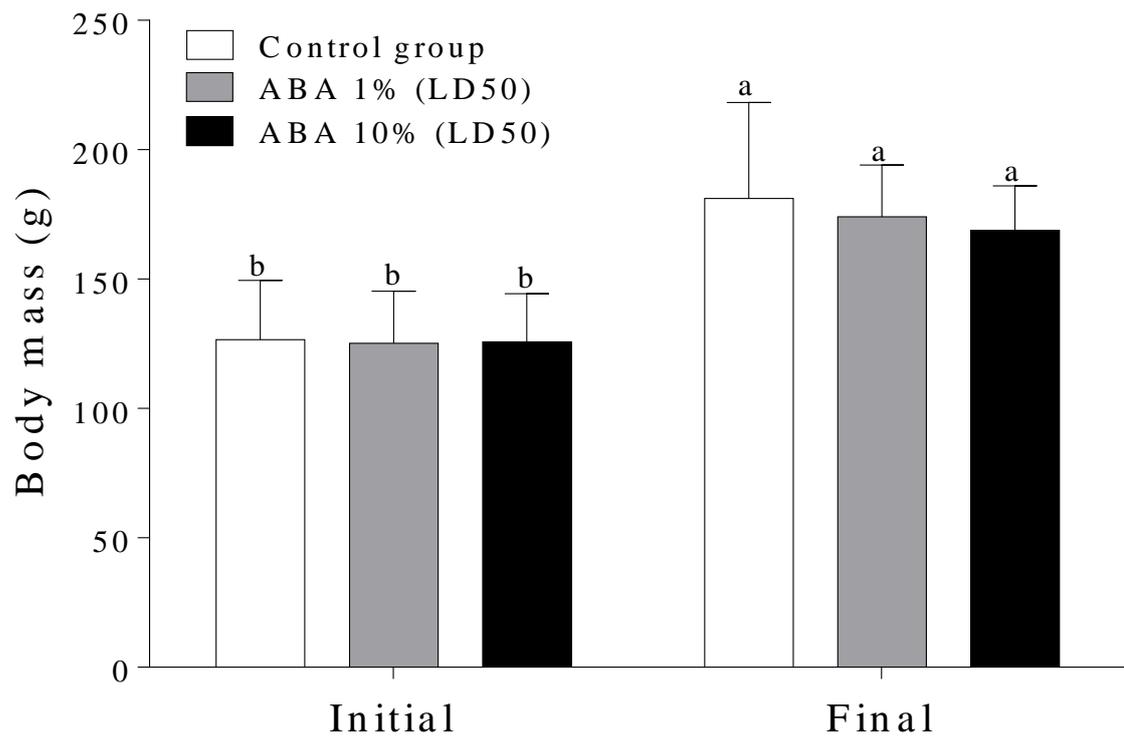
**Figure 4.** Frequency of erythrocytes with nuclear abnormalities in female *C. coturnix japonica* exposed, or not, to water containing abamectin. Bars indicate the mean + standard deviation of the collected data. Different lower case letters indicate statistically significant differences recorded through the analysis of variance (one-way ANOVA), at 5% probability. “Control group”: animals exposed to pure drinking water, without abamectin; “ABA 1% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 15.5 mg a.i./L of abamectin; and “ABA 10% LD<sub>50</sub> group”: animals exposed to water containing 155.0 mg a.i./L of abamectin. n=10, per experimental group.

**Figure 5.** Representation of erythrocytes and the morphology of nuclei observed in female *Coturnix coturnix japonica* exposed, or not, to water contaminated with abamectin (B1) ovoid – normal nucleus; (B2) asymmetrical constricted erythrocyte; (B3) symmetrical constricted erythrocyte; (B4) binucleated cell; (B5) moved nucleus; (B6) indented nucleus; and (B7) anucleated erythrocyte.

## FIGURES

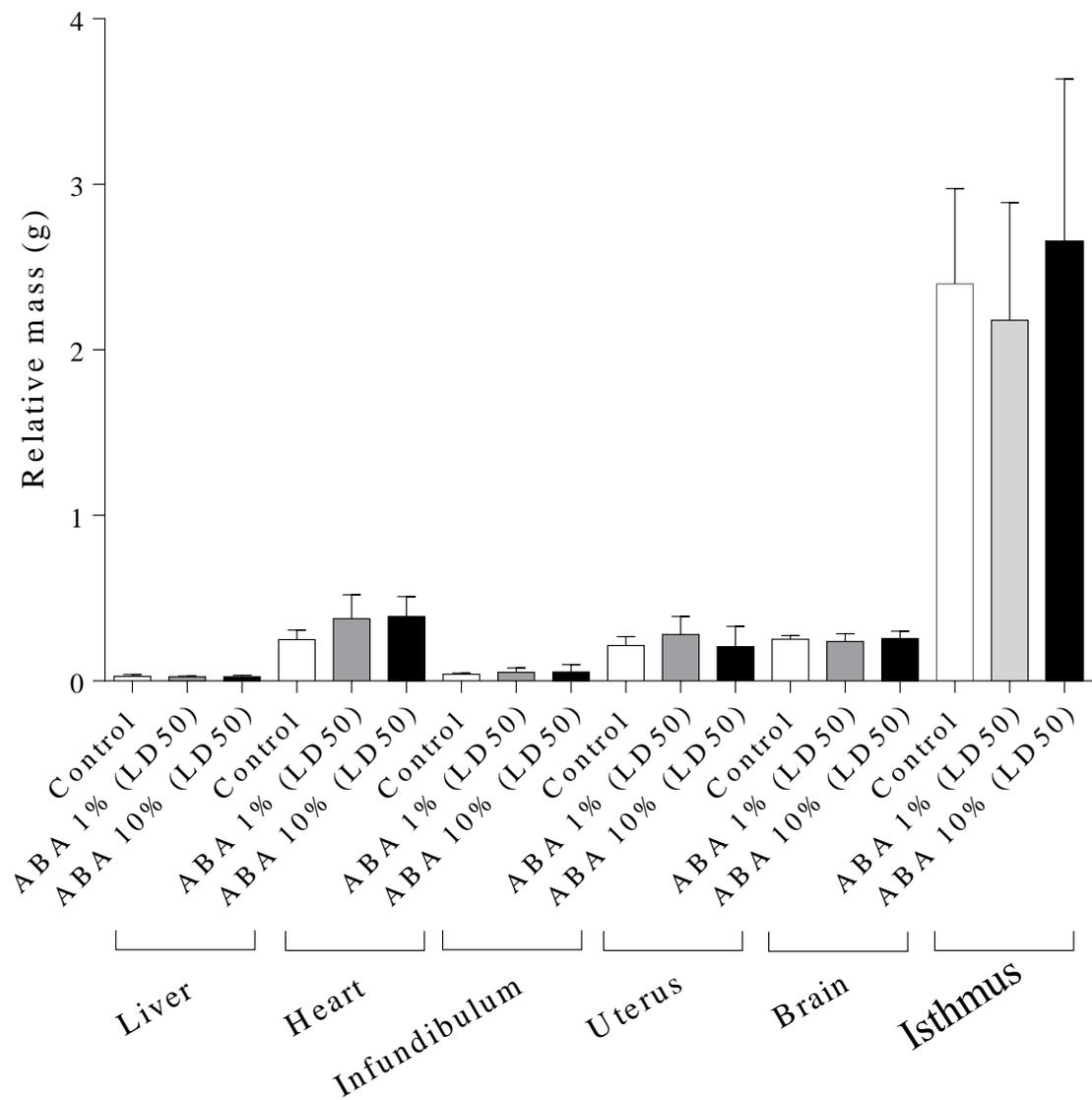


**Figure 1 (Supplementary Material)**



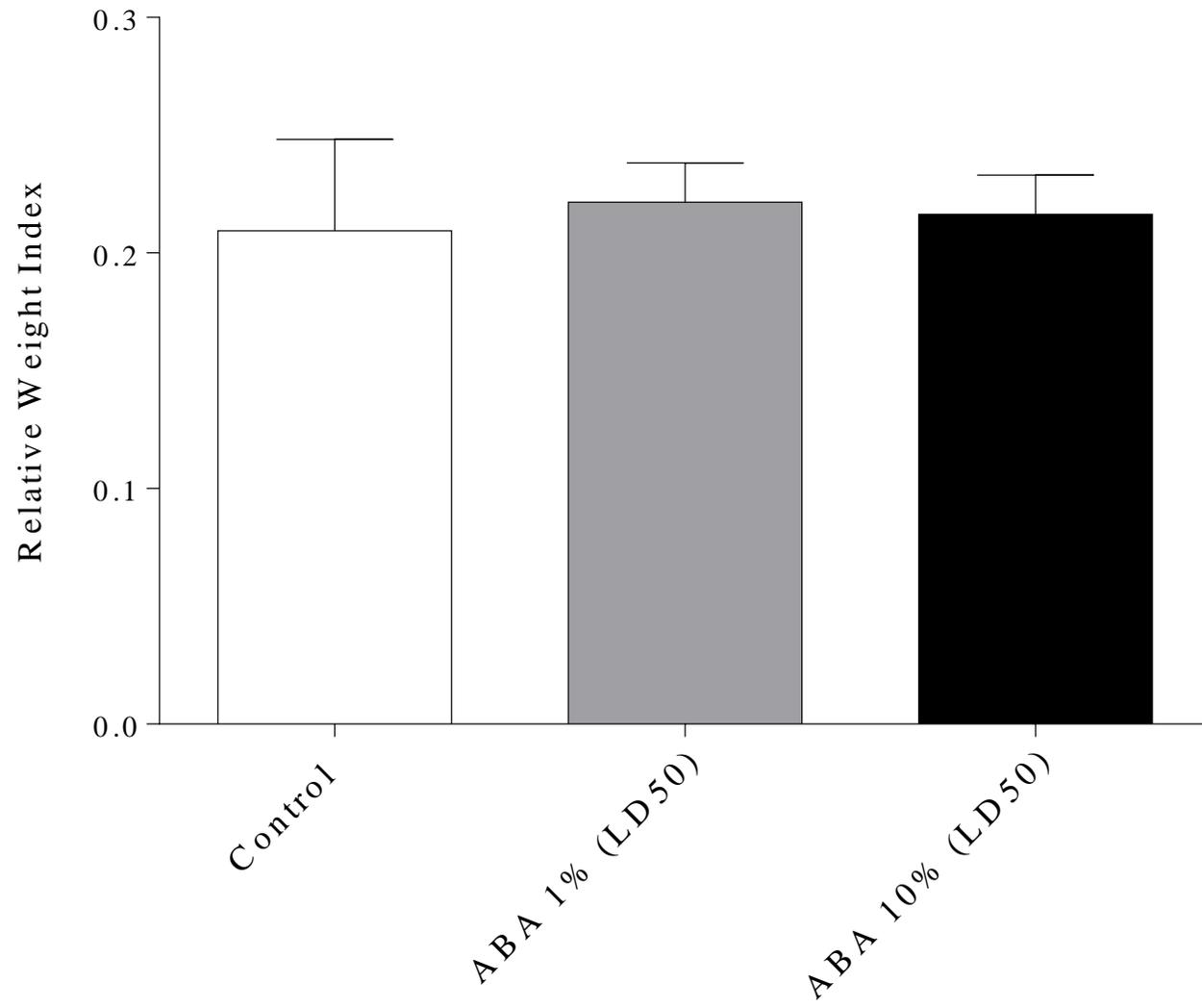
**Figure 2**

**A**

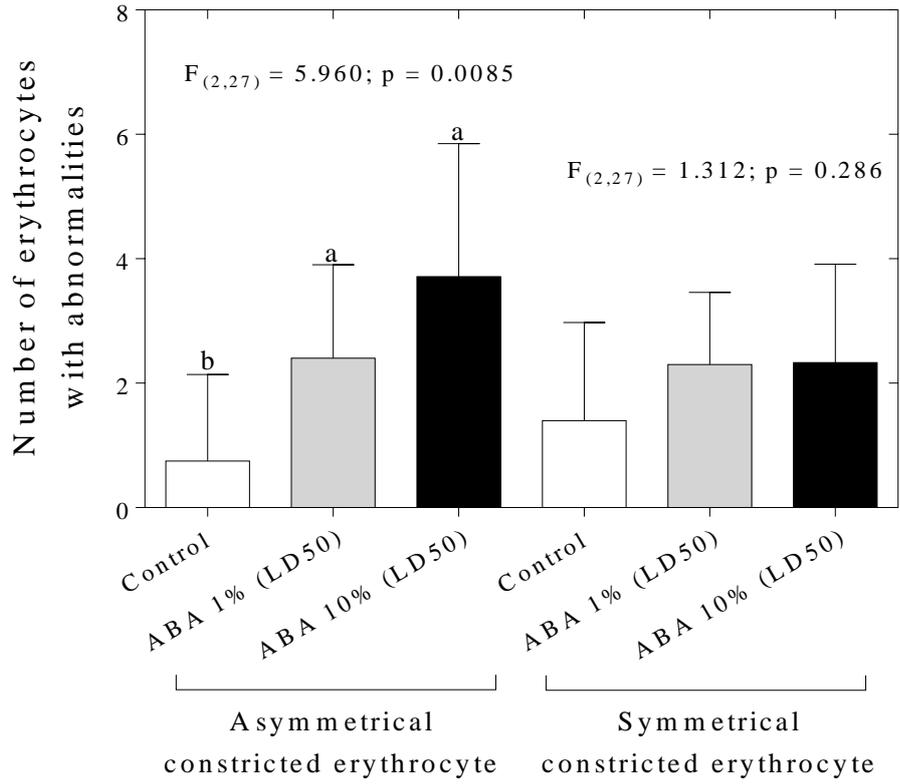
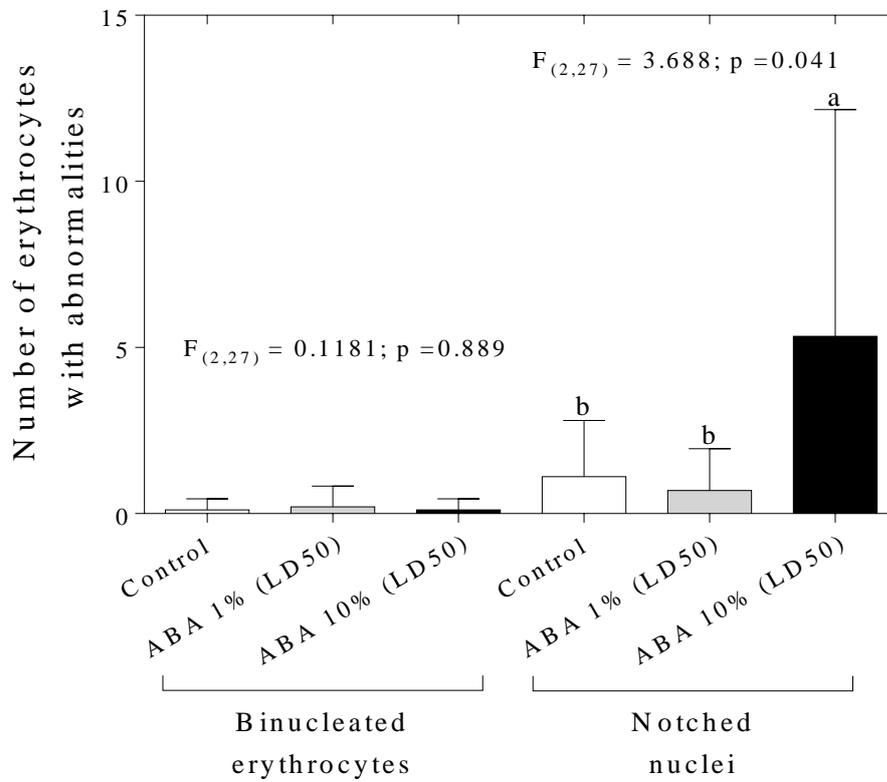


**Figure 3A**

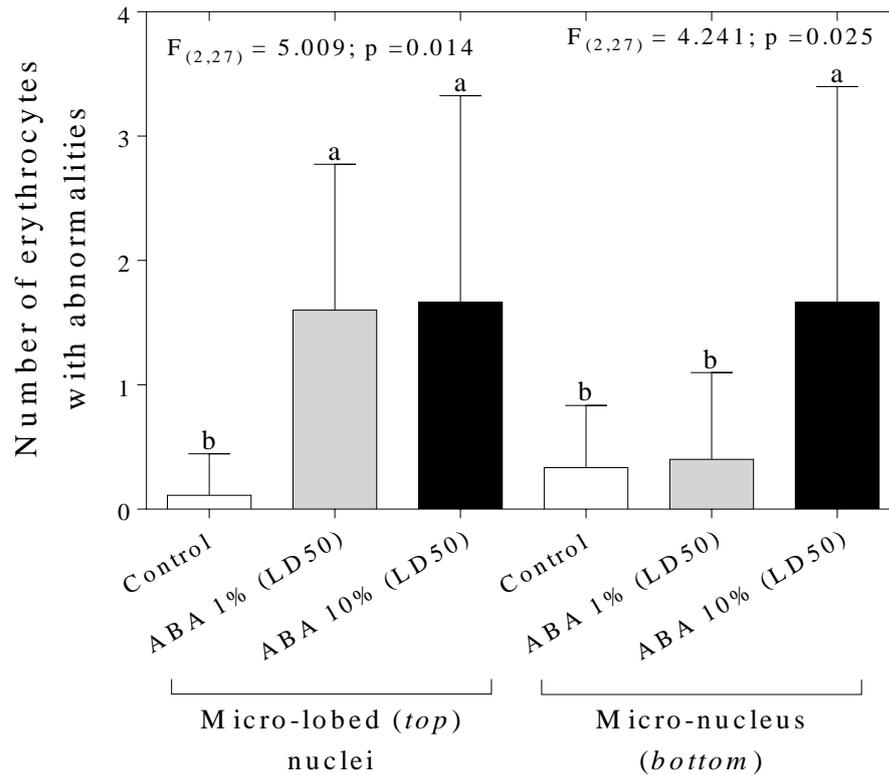
**B**



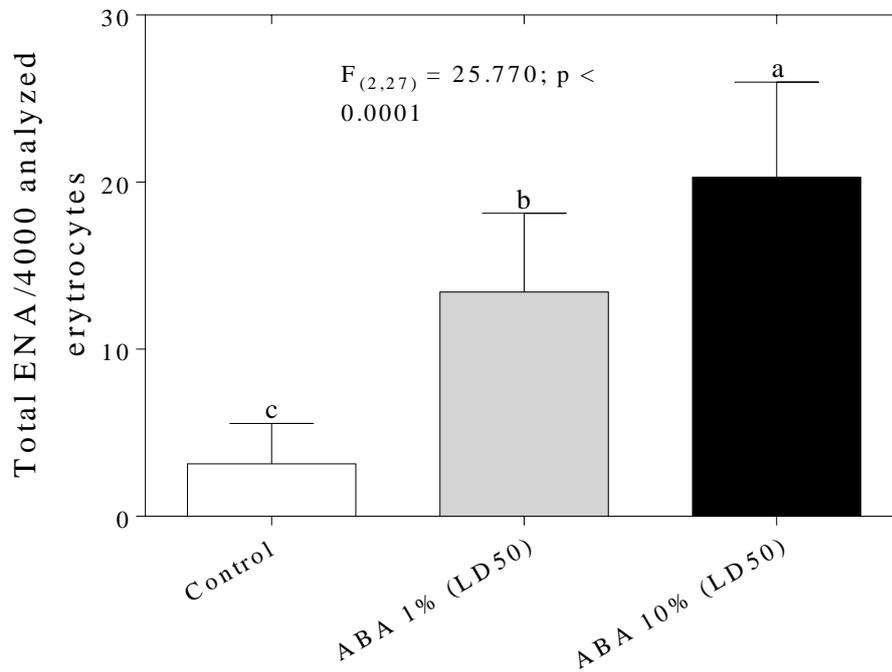
**Figure 3B**

**A****B****Figure 4A-B**

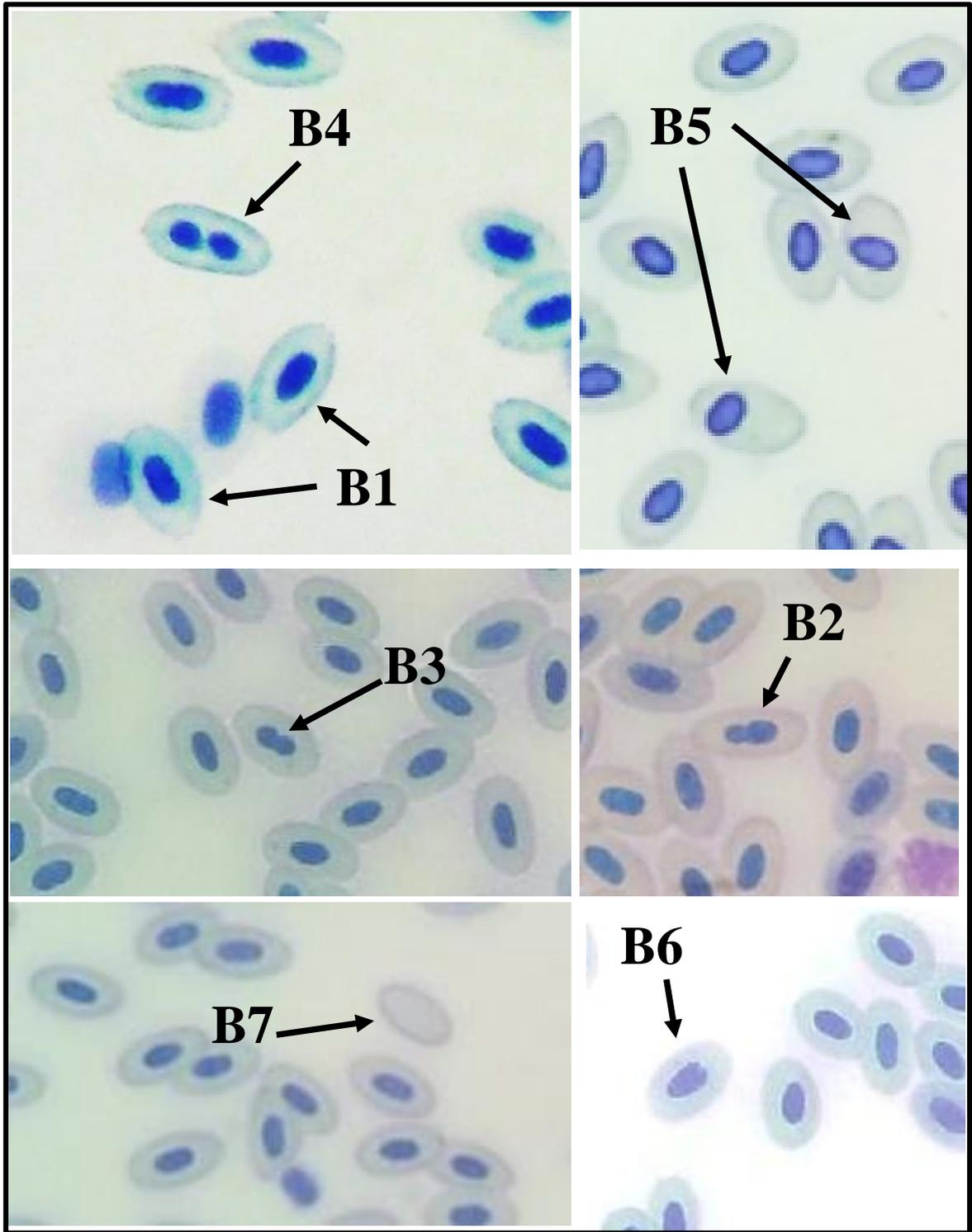
**C**



**D**



**Figure 4C-D**



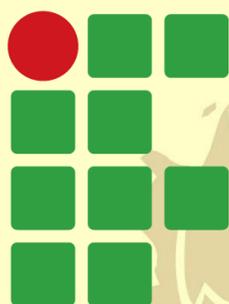
**Figure 5**

## CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO GERAL

---

Em conclusão, os animais que receberam abamectina em concentrações subletais obtiveram várias alterações comportamentais, e nos testes de respostas defensivas ao predador, fundamental para a sobrevivência, as fêmeas de *C. coturnix japonica*, tiveram um comportamento ansiolítico, não reconhecendo o predador como ameaça. Em relação aos resultados equivalentes às anormalidades nucleares, nossos dados demonstram que os animais que receberam tratamento apresentam maior frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias, o que poderia causar danos ao animal, como surgimento de câncer colocando em risco a vida dos indivíduos e a dinâmica de suas populações.

Dado o pioneirismo da nossa investigação, nossos resultados revelam apenas a “ponta do iceberg” que representa os prejuízos que a exposição à ABA pode ocasionar sobre a biologia comportamental das aves. Esses estudos podem contribuir enormemente para que possamos compreender melhor a magnitude do impacto que esse agrotóxico pode ocasionar nos ecossistemas. Sugerimos que novas investigações sejam realizadas afim de conhecermos e elucidarmos melhor o impacto que este pesticida causa em animais representativos do grupo das Aves. Por fim, apresentamos no Anexo I o artigo publicado na *Environmental Science and Pollution Research* referente ao Capítulo 2 desta dissertação.



# INSTITUTO FEDERAL

Goiano

---

Campus  
Urutaí

