



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E  
BIODIVERSIDADE**

**ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS COMO  
FERRAMENTAS DE BIOMONITORAMENTO POR AVES NO  
CERRADO**

**Vanessa Fonseca Gonçalves**

**2022**

**Vanessa Fonseca Gonçalves**

**ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS COMO FERRAMENTAS DE  
BIOMONITORAMENTO POR AVES NO CERRADO BRASILEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ecologia, Conservação e Biodiversidade.

Orientadora:

Profa. Dra. Celine de Melo

Coorientadora:

Profa. Dra. Kátia Gomes Facure Giaretta

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2022

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

---

G635a  
2022  
Gonçalves, Vanessa Fonseca, 1985-  
Anomalias nucleares eritrocitárias como ferramentas de  
biomonitoramento por aves no Cerrado brasileiro [recurso eletrônico] /  
Vanessa Fonseca Gonçalves. -2022.

Orientador: Celine de Melo.

Coorientadora: Katia Gomes Facure Giaretta.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.5306>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ecologia. I. Melo, Celine de, 1971-, (Orient.). II. Giaretta, Katia  
Gomes Facure, 1967-, (Coorient.). III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e  
Biodiversidade. III. Título.

---

CDU: 574

Glória Aparecida  
Bibliotecária - CRB-6/2047



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e  
 Biodiversidade

Av. Pará, 1720, Bloco 2D, Sala 26 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38405-320  
 Telefone: (34) 3225-8641 - www.pggeo.ib.ufu.br - ecologia@umarama.ufu.br



**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Ecologia, Conservação e Biodiversidade				
Defesa de:	Tese, número 76, PPGECB				
Data:	dez de fevereiro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	18:00
Matrícula do Discente:	11813ECR008				
Nome do Discente:	Vanessa Fonseca Gonçalves				
Título do Trabalho:	Anomalias nucleares eritrocitárias como ferramentas de biomonitoramento por aves no Cerrado				
Área de concentração:	Ecologia				
Linha de pesquisa:	Ecologia de comunidades e ecossistemas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Uso de aves como biomonitores da qualidade ambiental em ambientes florestais no Cerrado				

Reuniu-se por webconferência a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Biodiversidade, assim composta pelos(as) Doutores(as): Natália Mundim Tôrres- INBIO/UFU, César Cestari - INBIO/UFU, Lia Raquel de Souza Santos - IFGoiano, Solange Cristina Augusto - INBIO/UFU, Celine de Melo - INBIO/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Celine de Melo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Celine de Melo, Presidente**, em 10/02/2022, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Solange Cristina Augusto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/02/2022, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Natalia Mundim Torres, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/02/2022, às 18:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **César Cestari, Usuário Externo**, em 11/02/2022, às 14:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lia Raquel de Souza Santos, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3298457** e o código CRC **BE9C552E**.

Dedico aos meus pais Vania e Zezito,  
ao meu esposo Diego  
e a amiga Celine de Melo.

## AGRADECIMENTOS

Finalizar uma tese de doutorado é uma conquista pessoal e profissional. Foi um desejo que começou em 2013 e por algum motivo, que hoje entendo melhor, ficou “adormecido”; retornando em 2018. Aqui, portanto, deixo os meus agradecimentos às pessoas e às instituições que puderam contribuir para que esse sonho se concretizasse.

Aos meus pais, Vania e Zezito, por permitirem que eu chegasse até esse momento e por incentivarem a minha carreira profissional. Em especial, a minha mãe que sempre tinha palavras acolhedoras nos momentos de desânimo e frustração. Aos meus irmãos, Arthur e Sérgio, por sempre estarem presentes e deixarem a vida mais leve. Agora sou doutora!!! Ao meu esposo, amigo e companheiro, Diego Lemos, por estar comigo durante toda essa jornada, incentivando, apoiando, sempre com carinho, amor e paciência.

À minha orientadora-amiga, Profa. Celine de Melo, exemplo de mulher guerreira e profissional, por sempre ter me incentivado e nunca ter desistido de ser minha orientadora de doutorado, mesmo quando eu já tinha desistido. Celine, meus mais sinceros agradecimentos por me mandar email, todos os anos, convidando para tentar a seleção de doutorado. À coorientadora, Profa. Kátia Gomes, por ter aceitado o desafio de me coorientar e por sempre ser tão prestativa, respondendo as inúmeras dúvidas das análises e sugerindo ações que engradeceram a tese.

Aos meus amigos e colegas do GEECA, Camilla Baesse, Camila Teixeira, Diego, Giancarlo, Giovanna, Lucas, Luís Paulo, Luís Pedro, Pedro, Paulo Vitor e Vitor pelo auxílio e diversão durante as coletas de dados. Camilla e Vitor, meus agradecimentos pela parceria durante o teste experimental e coletas de campo. Luís Paulo e Paulo Vitor, meus agradecimentos pelo auxílio e pelas sugestões na parte escrita. Vitor, obrigada pelas fotos e mapas.

Aos membros da banca, pelas contribuições de suma importância para a tese. Aos professores do Instituto de Biologia pelos conceitos e teorias importantes para a minha formação acadêmica.

Aos colegas da Eseba UFU, em especial às amigas e amigo da área de Ciências, por serem compreensivas/o em relação às demandas da pós-graduação.

À Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico e pela possibilidade de afastamento integral para cursar a pós-graduação por dois anos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

## PREFÁCIO

A pesquisa teve como objetivo geral identificar e caracterizar as anomalias nucleares eritrocitárias (ANE's) de espécies de aves capturadas em ambientes florestais no Cerrado Mineiro e em canários belga expostos experimentalmente em ambientes urbano e rural, correlacionando-as com as características biológicas das espécies silvestres e com qualidade do ar em cada área de estudo e no teste experimental. Para isso, a tese foi estruturada em três capítulos, da seguinte forma:

### **Capítulo 1: Anomalias nucleares eritrocitárias em aves de fragmentos florestais do Cerrado brasileiro**

- Objetivo: descrever os tipos e as quantidades de ANE'S presentes em aves capturadas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro.

### **Capítulo 2: Efeitos da qualidade do ar na ocorrência de anomalias nucleares eritrocitárias em aves do Cerrado brasileiro**

- Objetivo: analisar a variação no número de ANE's em relação à massa corporal, nível de qualidade do ar e espécie.
- Hipótese: aves encontradas em locais com maior exposição à poluição atmosférica apresentam maiores quantidades de ANE's.

### **Capítulo 3: Influência do tempo de exposição da poluição atmosférica na frequência de anomalias nucleares eritrocitárias em canários-belga *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758)**

- Objetivo: comparar a frequência de ANE's de canários-belga mantidos em cativeiro na área urbana e rural.
- Hipótese: indivíduos de canário-belga expostos na área urbana apresentam maior frequência de ANE'S devido a maior exposição à poluição do ar.

Parte dos dados do capítulo 2 já foram publicados na forma de artigo científico: **Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in *Antilophia galeata***, na *Environmental Science and Pollution Research International* (qualis A2) em julho de 2020. DOI: [10.1007/s11356-020-10057-y](https://doi.org/10.1007/s11356-020-10057-y).



## Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in *Antilophia galeata*

Vanessa Fonseca Gonçalves<sup>1,2</sup> · Paulo Vitor Alves Ribeiro<sup>1,2</sup> · Caroliny Ferreira de Souza Oliveira<sup>1</sup> · Luís Paulo Pires<sup>1</sup> · Camilla Queiroz Baesse<sup>1</sup> · Luís Pedro Mendes Paniago<sup>1,2</sup> · Vitor Carneiro Guimarães Toletino<sup>1</sup> · Celine de Melo<sup>1</sup>

Received: 17 April 2020 / Accepted: 7 July 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

### Abstract

Air pollution can generate changes in the morphology, physiology, and behavior of several animals, including birds, which, when responding to such environmental changes, can be used as biomonitors. Quantitative and qualitative analyses of erythrocyte nuclear anomalies comprise a useful tool for biomonitoring, with anucleated erythrocytes, called erythroplastids, being particularly significant. The objectives of the present study were to quantify the presence of erythroplastids in *Antilophia galeata* and relate their presence to distance from the nearest urban environment. Blood smears were analyzed for 80 individuals of *A. galeata* captured between June 2013 and October 2018 in five Cerrado forest fragments of different sizes and with different influences from urbanization. The quantity of erythroplastids differed among areas, with it being greater in fragments within a proximity with urban, and less in highly preserved areas far from an urban environment. Quantification of erythroplastids in *A. galeata* proved to be a useful tool for monitoring air quality.

**Keywords** Birds · Biomonitoring · Erythrocytes · Air quality · Blood · Nuclear abnormalities

## ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii

### **CAPÍTULO 1: ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS EM AVES DE FRAGMENTOS FLORESTAIS DO CERRADO BRASILEIRO**

Resumo	2
Abstract	3
Introdução	4
Metodologia	5
Resultados	7
Discussão	14
Conclusão	20
Referências	21

### **CAPÍTULO 2: EFEITOS DA QUALIDADE DO AR NA OCORRÊNCIA DE ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS EM AVES DO CERRADO BRASILEIRO**

Resumo	27
Abstract	28
Introdução	29
Metodologia	31
Resultados	35
Discussão	42
Conclusão	46
Referências	46
Apêndices	50

### **CAPÍTULO 3: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA NA FREQUÊNCIA DE ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS EM CANÁRIOS-BELGA *SERINUS CANARIA* (LINNAEUS, 1758)**

Resumo	53
Abstract	55

Introdução	56
Metodologia	58
Resultados	60
Discussão	64
Conclusão	67
Referências	67

## **RESUMO**

Gonçalves, V. F. 2022. Anomalias nucleares eritrocitárias como ferramentas de biomonitoramento por aves no Cerrado. Tese de Doutorado em Ecologia, Conservação e Biodiversidade. UFU. Uberlândia – MG. 82f.

Os distúrbios ambientais, como a poluição atmosférica, provocam perturbações nas comunidades e podem levar à extinção de algumas espécies ou gerar efeitos mutagênicos, como Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE), nos indivíduos que permanecem nos ambientes. As ANE's são definidas como danos genéticos no núcleo das células, sendo utilizadas como biomarcadores para avaliar o potencial efeito de xenobióticos em aves. Nesse sentido, foi descrito os tipos de ANE's encontrados em aves silvestres do Cerrado brasileiro e investigada a influência da qualidade do ar na quantidade de anomalias em aves silvestres e em um teste experimental com canários-belgas. As capturas de aves ocorreram em seis áreas de florestas estacionais semidecíduais do Cerrado Mineiro, sendo classificadas de acordo com o nível de qualidade do ar. Para os testes experimentais, os canários foram divididos em dois grupos, expostos por 120 dias à dois tipos de ambientes: rural e urbano. As aves foram identificadas e marcadas com anilhas metálicas; em seguida, foi feita a coleta de sangue para confecção de esfregaços sanguíneos que foram analisados com auxílio de microscópio ótico. Foram registrados 7 tipos de ANE's, que se correlacionaram entre si, em 11 espécies de Passeriformes, sendo: célula binucleada, eritroplástideo, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado. A quantidade de ANE's nas amostras de sangue de cinco espécies de aves silvestres foi influenciada pelo nível de qualidade do ar, sendo maior nos locais com má qualidade, sem distinção entre as espécies analisadas. Em relação ao teste experimental, os canários do ambiente urbano também apresentaram maiores quantidades de ANE's. Portanto, a má qualidade do ar parece ser um fator favorável ao surgimento de ANE's em aves, sendo possível o uso desse biomarcador em estudos de biomonitoramento.

Palavras-chave: alterações celulares; avifauna; biomarcador; biomonitores; qualidade do ar; poluentes.

## **ABSTRACT**

Gonçalves, V. F. 2022. Erythrocyte Nuclear Abnormalities as a biomonitoring technique in birds in the Brazilian Cerrado. PhD Thesis. Tese de Doutorado em Ecologia, Conservação e Biodiversidade. UFU. Uberlândia – MG. 82f.

Environmental disturbances, such as air pollution, may affect biological communities in several ways, from species extinction to causing mutagenic effects. One of these latter is Erythrocyte Nuclear Abnormalities (ENAs), which are defined as genetic damage to the cell nucleus. ENAs have been used as biomarkers to assess the potential effects of mutagens in birds. Thus, here we described the ENAs found in free-living bird species in the Brazilian Cerrado and we investigated the influence of air quality in the number of anomalies in both wild species and captive individuals of the Atlantic canary. Bird captures took place in six semideciduous forests from the Cerrado of the State of Minas Gerais in Brazil. Each of these forests were classified according to their air quality. Atlantic canaries were used in experimental trials. Wild birds were identified and both wild species and Atlantic canaries were tagged with metal bands and then, we collected blood to prepare blood smears, which were assessed in optical microscope. We observed 7 related types of ENAs in 11 species of Passeriformes: binucleate cell, erythroplastid, displaced nucleus, slotted nucleus, asymmetric constriction, symmetric constriction, and lobed nucleus. The number of ENAs in blood samples from five wild species was related to air quality, i.e. it was higher in areas where air quality was poorer, without distinction among species. The experimental trial showed the same patterns because canaries in the urban areas had higher quantities of ENAs. Therefore, we suggest that bad air quality is the main driver of ENAs in birds, and that this biomarker may be used in biomonitoring studies.

Keywords: cell alterations; avifauna; biomarker; biomonitoring; air quality; pollutants.

## **CAPÍTULO 1**

### **ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS EM AVES DE FRAGMENTOS FLORESTAIS DO CERRADO BRASILEIRO**

## Resumo

O eritrócito das aves apresenta um formato ovoide, com um núcleo, também ovoide, localizado na região central da célula. As Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) são definidas como danos genéticos no núcleo das células. Podem ser utilizadas como biomarcadores, para avaliar, de forma qualitativa e quantitativa, o dano causado pela exposição a agentes de genotoxicidade. O objetivo desse estudo foi descrever os tipos e as quantidades de ANE'S presentes em aves capturadas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro. O estudo foi realizado em seis áreas florestais estacionais semidecíduais onde as aves foram capturadas com redes de neblina durante os meses de junho de 2013 a novembro de 2019. Após a captura, as aves foram identificadas e marcadas com anilhas metálicas, e em seguida, foi feita a coleta de sangue para confecção de esfregaços sanguíneos que foram analisados com auxílio de microscópio ótico. Das 886 amostras de 11 espécies da ordem Passeriformes, 50,2% apresentam pelo menos algum tipo de ANE's. As ANE's registradas foram: célula binucleada, eritroplástico, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado; sendo o núcleo deslocado a mais abundante. A Análise de Componentes Principais foi efetiva em ordenar as espécies, conforme o grau de susceptibilidade a desenvolver ANE's, sendo *Antilophia galeata* a mais susceptível e *Lathrotriccus euleri* a menos. Além disso, foi observada a existência de correlação linear entre os pares de tipos de ANE's, o que pode ser explicado pelo processo de formação e desenvolvimento das anomalias. Foi possível identificar três grupos de espécies de acordo com a similaridade na proporção de amostras com ANE's, o que pode estar relacionado com características intrínsecas ou extrínsecas das espécies. Trata-se do primeiro relato descritivo de ANE's em aves de ambientes silvestres. Vale ressaltar que é importante em estudos futuros incluir outros aspectos, como: qualidade do ambiente, habitat, número de células, amostras e comportamento das espécies investigadas.

Palavras-chave: alterações; eritrócitos; Passeriformes.

## Erythrocyte nuclear abnormalities in birds from forest fragments in the Brazilian Cerrado

### Abstract

Birds' erythrocytes have an ovoid shape with an ovoid nucleus that are located in the central part of the cell. Erythrocyte nuclear abnormalities (ENAs) are defined as genetic damage in the cell nucleus, and they are used as biomarkers, mainly in experimental tests, to assess the quantitative and qualitative damage caused by the exposure to genotoxic agents. Here, we aimed to describe the types and quantities of ENAs in birds captured in forest environments in the Brazilian Cerrado. The birds were captured in six semideciduous forests from June 2013 to November 2019. After they were captured, birds were identified and tagged with metal bands; then, we collected blood to prepare blood smears, which were assessed in optical microscope. About half (50.2%) of the 886 samples from 11 species of the order Passeriformes had some kind of ENA. The ENA we found were: binucleate cell, erythroplastid, displaced nucleus, slotted nucleus, asymmetric constriction, symmetric constriction, and lobed nucleus. PCA (Principal Component Analysis) was effective in ordering bird species, according to their likelihood of developing ENAs. *Antilophia galeata* was the most susceptible species and *Lathrotriccus euleri* was the least susceptible species. Moreover, we observed a linear correlation between pairs of ENAs, which can be explained by the formation and development of these anomalies. We were able to identify three groups of species according to their similarity in the proportion of samples with ENAs, which may be related to intrinsic or extrinsic species traits. To our knowledge, this is the first descriptive essay of ENAs in wild environments.

Keywords: alterations; erythrocytes; Passeriformes.

## INTRODUÇÃO

Os eritrócitos das aves geralmente são ovoides com a presença de um núcleo, também ovoide, localizado na região central da célula (CAMPBELL, 2015; CLARK, BOARDMAN; RAIDAL, 2009), sendo que o tamanho e as proporções relativas do eritrócito e do núcleo variam entre as espécies (HARTMAN; LESSLER, 1963). O núcleo das células das aves podem apresentar alterações ou danos, podendo ser detectados por algumas técnicas, como a análise de micronúcleo (BAESSE et al., 2015, 2019) e de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) (CLARK, 2015; QUERO et al., 2016; SOUZA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020).

As ANE's são definidas como danos genéticos que podem ser causados por substâncias tóxicas (BARBOSA et al., 2013; CORDUK et al., 2018) e ocorrem em indivíduos que permanecem em ambientes com efeitos de agentes genotóxicos (SERRANO-GARCÍA; MONTERO-MONTOYA, 2001; MITKOVSKA; CHASSOVNIKAROVA, 2020). As ANE's podem ser induzidas por estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) ou aneugênicos (indução de aneuploidias ou segregação cromossômica), defeitos genéticos do ciclo celular, reparação do DNA, deficiência de nutrientes importantes para o metabolismo do DNA e separação dos cromossomos (BAESSE et al., 2015; SOUTO et al., 2018; SOUZA et al., 2017; STOIBER et al., 2004). Esse biomarcador permite avaliar, de forma qualitativa e quantitativa, o dano ao DNA causado pela exposição aos agentes de genotoxicidade de curto ou longo prazo (MONSERRAT et al., 2007; MITKOVSKA; CHASSOVNIKAROVA, 2020).

Os estudos com ANE's em aves são escassos (GHAFAR et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020; HUSSAIN et al., 2015; SILVEIRA ET AL. 2021), sendo a maioria baseado em testes experimentais com espécies exóticas (MAS et al., 2015). Durante uma pesquisa sobre malária no Brasil, Franco (1943), registrou, ao acaso, anomalias do tipo núcleo em constrição

e núcleos fendidos em pardais (*Passer domesticus*). Lucas e Jamroz (1961) descreveram variações morfológicas, como células sanguíneas sem núcleos, denominadas eritroplástideo, encontradas em galos domésticos (*Gallus gallus domesticus*). Recentemente, Clark (2015) também relatou algumas alterações no núcleo dos eritrócitos de uma espécie de ave, a *Lophochroa leadbeateri* como: constrição simétrica, constrição assimétrica e células com micronúcleo e núcleo multilobulado. Complementando as informações sobre ANE's em aves, Souza et al. (2017) registraram núcleo deslocado, eritroplástideo e micronúcleo nas células sanguíneas de periquitos australianos (*Melopsittacus undulates*).

Com o objetivo de contribuir para a identificação de anomalias eritrocitárias em aves para ações de biomonitoramento, o presente estudo visou descrever os tipos e as quantidades de ANE'S presentes em aves capturadas de ambientes florestais do Cerrado brasileiro.

## **METODOLOGIA**

### ***Áreas de estudo***

O estudo foi realizado em seis áreas de florestas estacionais semidecíduais no Cerrado brasileiro, com tamanho e localizações diferentes: Mata da Fazenda Água Fria (18°29'47"S, 48°22'44"O), Mata da Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro (19°12'39"S, 47°08'19"O), Mata da Fazenda Experimental do Glória – UFU (18°57'05"S, 48°12'20"O), Mata da Fazenda São José (18°51'39"S, 48°13'51"O), Mata do Parque do Sabiá (18°54'33"S, 48°13'48"O) e Mata do Parque Municipal Victorio Siquierolli (18°52'24"S, 48°17'07"O).

### ***Coleta de dados***

As aves foram capturadas com redes de neblina durante quatro dias por campanha entre junho de 2013 e novembro de 2019, totalizando quatro campanhas em cada estação

(seca e chuva) por área. Após a captura, as aves foram marcadas com anilhas de metal (CEMAVE / Padrão ICMBio Projeto 3730, Registro 359076). Em seguida, foram realizadas coletas de sangue com agulhas descartáveis (0,8x0,3 mm) inseridas na veia metatársica dos indivíduos capturados (SISBIO/ICMBio – Autorização: 44901). O sangue foi gotejado diretamente em lâminas para a confecção dos esfregaços sanguíneos e identificados com o número da anilha da ave correspondente.

Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol (BAESSE et al., 2015, 2019; SCHMID, 1976), corados com solução de GIEMSA 5% e tampão fosfato ((BAESSE et al., 2015, 2019; PALHARES; GRISOLIA, 2002), lavados com água destilada, secos à temperatura ambiente.

As aves renovam os eritrócitos em um período de 25 a 45 dias (JONES, 2015), sendo assim, os indivíduos que foram recapturados após o intervalo de no mínimo 45 dias tiveram os esfregaços analisados, sendo cada recaptura considerada uma nova unidade amostral. Para a análise dos esfregaços foi considerada as espécies que tiveram no mínimo cinco indivíduos em pelo menos uma das áreas de estudo. Além disso, as amostras provenientes de indivíduos com mudas e/ou infecções por ectoparasitas foram descartadas, evitando a influência desses aspectos nas células sanguíneas.

As lâminas foram analisadas seguindo o modelo *zig-zag* com auxílio de microscópio ótico (Nikon Eclipse E200) com objetiva de 100x (BAESSE et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020). Para análise da quantidade e dos tipos de ANE's foi feita a observação de 5000 eritrócitos por indivíduo.

### ***Análises estatísticas***

A quantidade e os tipos de ANE's por espécie foram submetidos a uma Análise de Componentes Principais (ACP) para ordenar as espécies em função da sua susceptibilidade a

desenvolver anomalias eritrocitárias e avaliar as relações entre os tipos de anomalias. Para a ACP, a quantidade de ANE's foi previamente transformada em logaritmo, usando a transformação  $\log(x+1)$ . Os dados também foram previamente padronizados para que todas as variáveis tivessem o mesmo peso na análise, escolhendo a opção de usar matriz de correlação. Para avaliar as relações indicadas pela ACP entre os tipos de ANE's foram construídos gráficos de dispersão e calculados os coeficientes de correlação linear de Pearson.

Para verificar a existência de grupos de espécies com susceptibilidade semelhante para desenvolver ANE's foi realizada uma Análise de Agrupamento (Cluster), utilizando a medida de distância Bray Curtis entre pares de espécies e UPGMA como método de agrupamento.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do software *R* (*R Development Core Team 2019*), sendo as análises conduzidas em nível de significância de  $p < 0,05$  (ZAR, 2013).

## RESULTADOS

Foram analisadas 886 amostras de 11 espécies da Ordem Passeriformes (*Antilophia galeata*, *Basileuterus culicivorus*, *Conopophaga lineata*, *Corythopsis delalandi*, *Eucometis penicillata*, *Lathrotriccus euleri*, *Leptopogon amaurocephalus*, *Myiothlypis flaveola*, *Tolmomyias sulphurescens*, *Turdus leucomelas*, *Turdus rufiventris*), sendo que 444 amostras (50,2%) apresentaram pelo menos algum tipo de alteração na morfologia do núcleo do eritrócito e 442 (49,8%) nenhum tipo de anomalia. Destas 444 amostras, 178 (40,1%) tinha apenas um tipo de ANE's e 266 (59,9%) apresentaram mais de um tipo.

As ANE's registradas foram: célula binucleada, eritroplástideo, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado<sup>1</sup> (Figura 1). Dentre as 444 amostras com ANE's, foram observados 999 eritrócitos com algum tipo de

---

<sup>1</sup> As terminologias usadas para nomear as ANE's foram baseadas nos estudos de Clark (2014) e Souza et al. (2017).

anomalia, sendo que o núcleo deslocado foi o tipo mais abundante (n= 484; 48,45%); ao contrário do núcleo multilobulado que foi registrado apenas quatro vezes (Tabela 1). Célula binucleada, núcleo entalhado e núcleo deslocado foram as anomalias observadas em todas as espécies e núcleo multilobulado apenas em quatro espécies, a saber: *A. galeata*, *E. penicillata*, *L. amaurocephalus* e *T. sulphurescens* (Tabela 1).

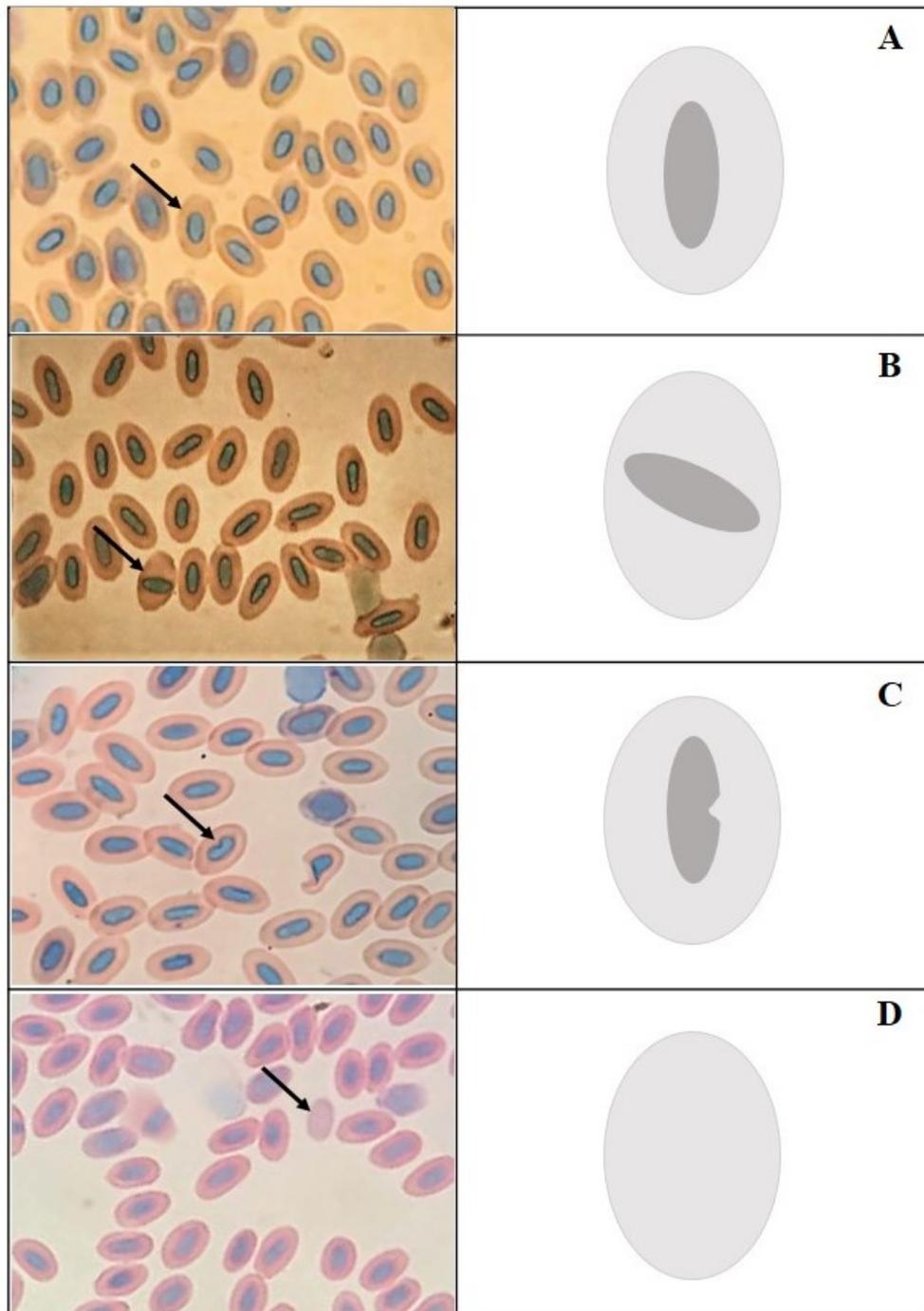


FIGURA 1: Representações: imagens com setas (1ª coluna) e esquemas (2ª coluna) de eritrócitos e tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em aves capturadas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro: A- eritrócito com núcleo ovoide (normal); B- núcleo deslocado; C- núcleo entalhado; D- eritroplástico.

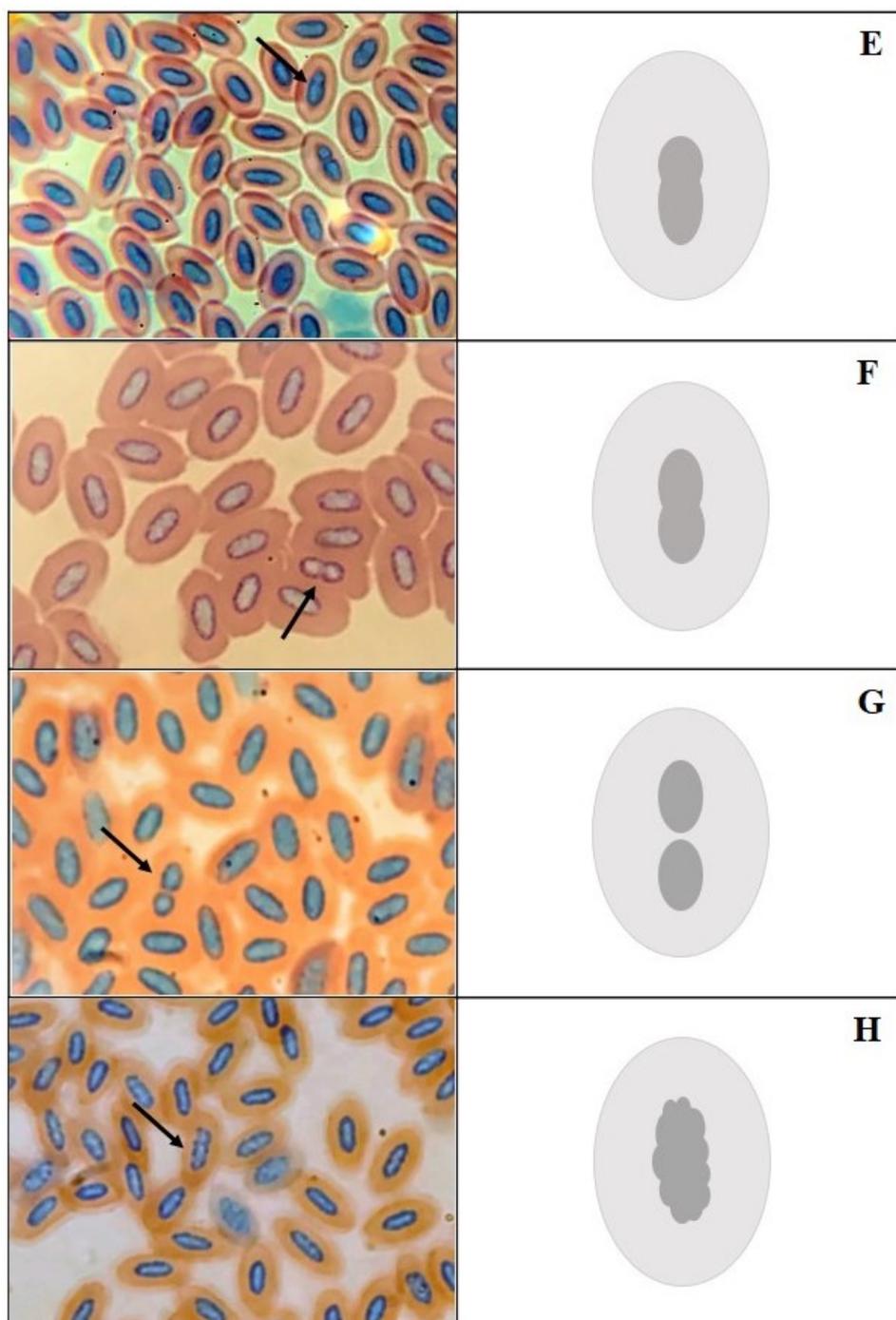


FIGURA 1 (continuação): Representações: imagens com setas (1ª coluna) e esquemas (2ª coluna) de eritrócitos e tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em aves capturadas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro: E- constrição assimétrica; F- constrição simétrica; G- célula binucleada; H- núcleo multilobulado.

TABELA 1: Análise quantitativa dos tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em Passeriformes capturados em ambientes florestais do Cerrado brasileiro.

<b>Tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias</b>	<b>Número de eritrócitos com anomalia (%)</b>	<b>Porcentagem de espécies com anomalia</b>
<b>Constricção assimétrica</b>	89 (8,91)	91%
<b>Célula binucleada</b>	61 (6,11)	100%
<b>Constricção simétrica</b>	79 (7,91)	91%
<b>Eritroplastídeo</b>	118 (11,81)	91%
<b>Núcleo entalhado</b>	164 (16,42)	100%
<b>Núcleo multilobulado</b>	4 (0,40)	36%
<b>Núcleo deslocado</b>	484 (48,4)	100%
<b>TOTAL</b>	999	11

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi efetiva em ordenar as espécies, conforme o grau de susceptibilidade a apresentar ANE's, ao longo do gradiente representado pelo primeiro componente principal (eixo 1), sendo *A. galeata* a mais susceptível e *L. euleri* a menos. O primeiro eixo da ACP explicou sozinho 81,66% da variância e o segundo eixo explicou 9,73% (Figura 2).

No gráfico biplot dos dois primeiros eixos da ACP, com as espécies representadas como pontos e as variáveis (tipos de anomalias) como vetores, também foi possível perceber que os diferentes tipos de anomalias estão correlacionados positivamente entre si (Figura 2). É possível perceber que as espécies com os menores números de anomalias por amostras (*L. euleri*, *C. lineata*, *C. delalandi* e *T. rufiventris*) ficaram do lado positivo do primeiro componente principal e as demais ficaram do lado negativo, com a espécie *A. galeata* no extremo esquerdo (Figura 2).

Os tipos de ANE's mais fortemente correlacionados com o primeiro componente principal em ordem de importância foram: constricção simétrica ( $r = -0,974$ ), eritroplastídeo ( $r$

= -0,970), núcleo deslocado ( $r = -0,968$ ), núcleo entalhado ( $r = -0,938$ ), célula binucleada ( $r = -0,906$ ) e constrição assimétrica ( $r = -0,881$ ), todos correlacionados negativamente com esse eixo (Figura 2).

A anomalia do tipo núcleo multilobulado se correlacionou negativamente com o eixo 1 (-0,642) e positivamente com o eixo 2 (0,760), separando no segundo quadrante as espécies *E. penicillata*, *T. sulphurescens*, *L. amaurocephalus* e *A. galeata*, que foram as únicas que apresentaram esse tipo de anomalia (Figura 2).

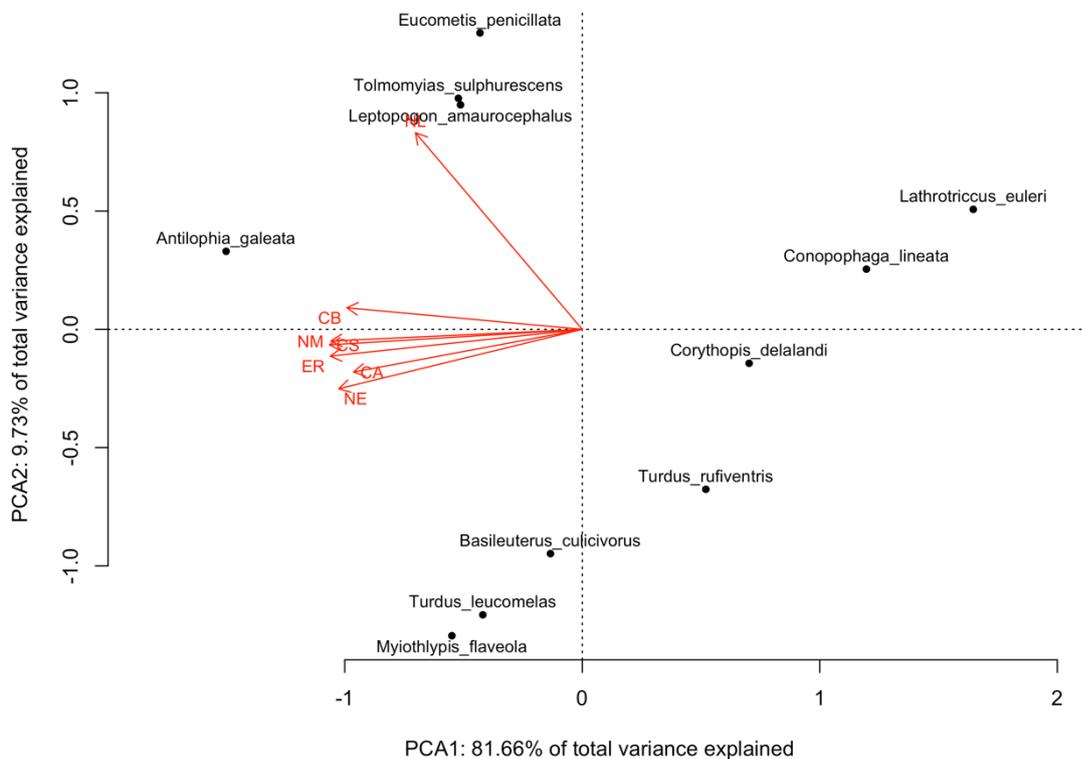


FIGURA 2: Gráfico biplot da Análise de Componentes Principais, evidenciando as variáveis (tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias -ANE's- em Passeriformes capturados em ambientes florestais do Cerrado brasileiro) de acordo com a sua importância nos dois primeiros eixos. Legenda: CA- constrição assimétrica; CB- célula binucleada; CS- constrição simétrica; NE- núcleo entalhado; ER- eritroplastídeo; NL- núcleo multilobulado; NM- núcleo deslocado.

Os gráficos de dispersão e os coeficientes de correlação de Pearson indicaram a existência de correlação linear entre os pares de tipos de ANE's (Figura 3), sendo que valores

dos coeficientes da correlação foram altos e significativos, com exceção da anomalia núcleo multilobulado, que apenas se correlacionou com o tipo constrição simétrica.

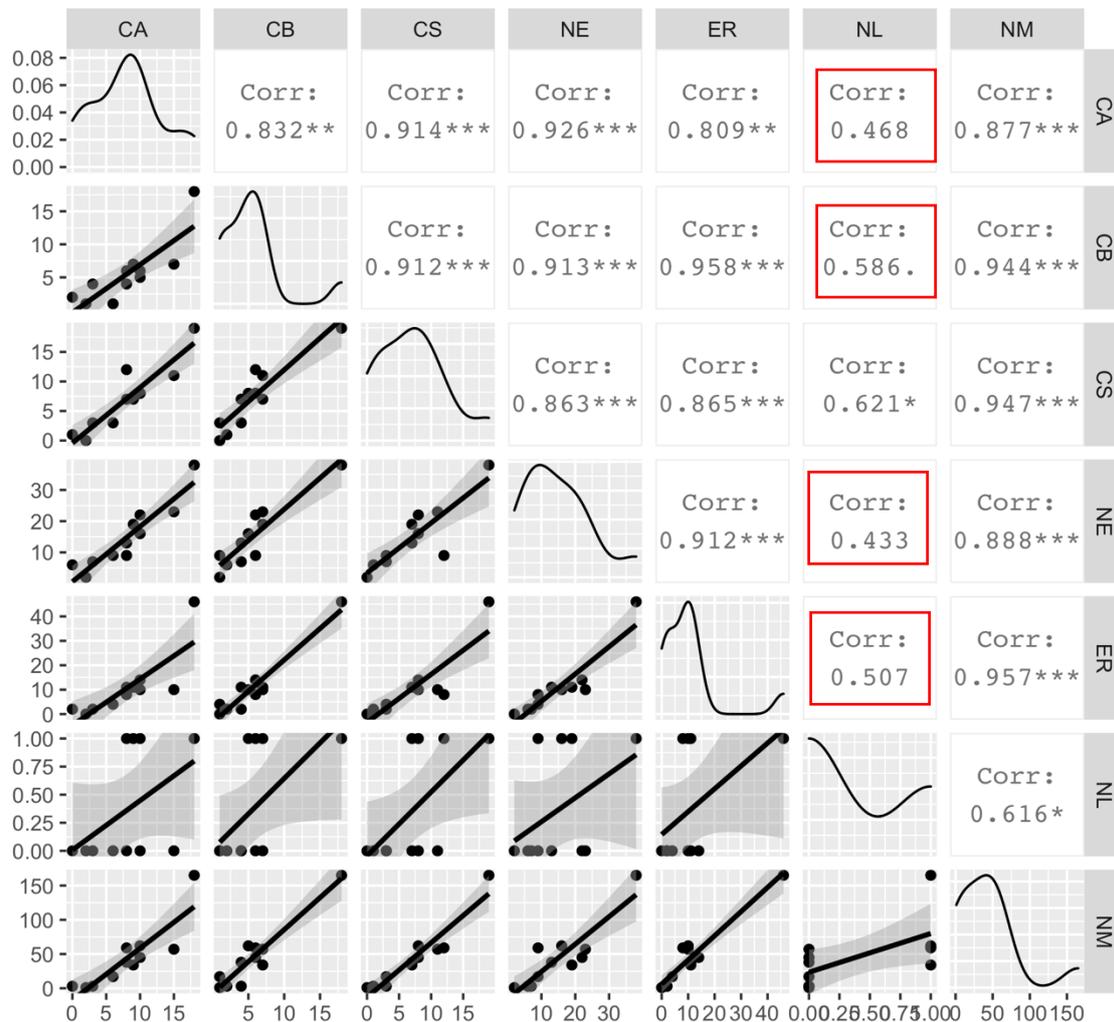


FIGURA 3: Gráficos de dispersão e coeficientes de correlação linear de Pearson referentes às relações entre os tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias -ANE's- em Passeriformes capturados em ambientes florestais do Cerrado brasileiro. Legenda: CA- constrição assimétrica; CB- célula binucleada; CS- constrição simétrica; NE- núcleo entalhado; ER- eritroplastídeo; NL- núcleo multilobulado; NM- núcleo deslocado. O \* indica significância estatística, sendo \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$  e \*\*\*:  $p < 0,0001$ . O retângulo vermelho indica ausência de significância estatística:  $p > 0,05$ .

A partir do dendrograma da Análise de Agrupamento foi possível identificar três grupos de espécies de acordo com a similaridade na proporção de amostras com ANE's

(Figura 4): O primeiro grupo foi formado por uma única espécie: *A. galeata*; o segundo grupo foi formado por: *T. rufiventris*, *E. penicillata*, *T. sulphurens*, *L. amaurocephalus*, *B. culicivorus*, *M. flaveola* e *T. leucomelas*) e o terceiro grupo, pelas espécies *L. euleri*, *C. lineata* e *C. delalandi*.

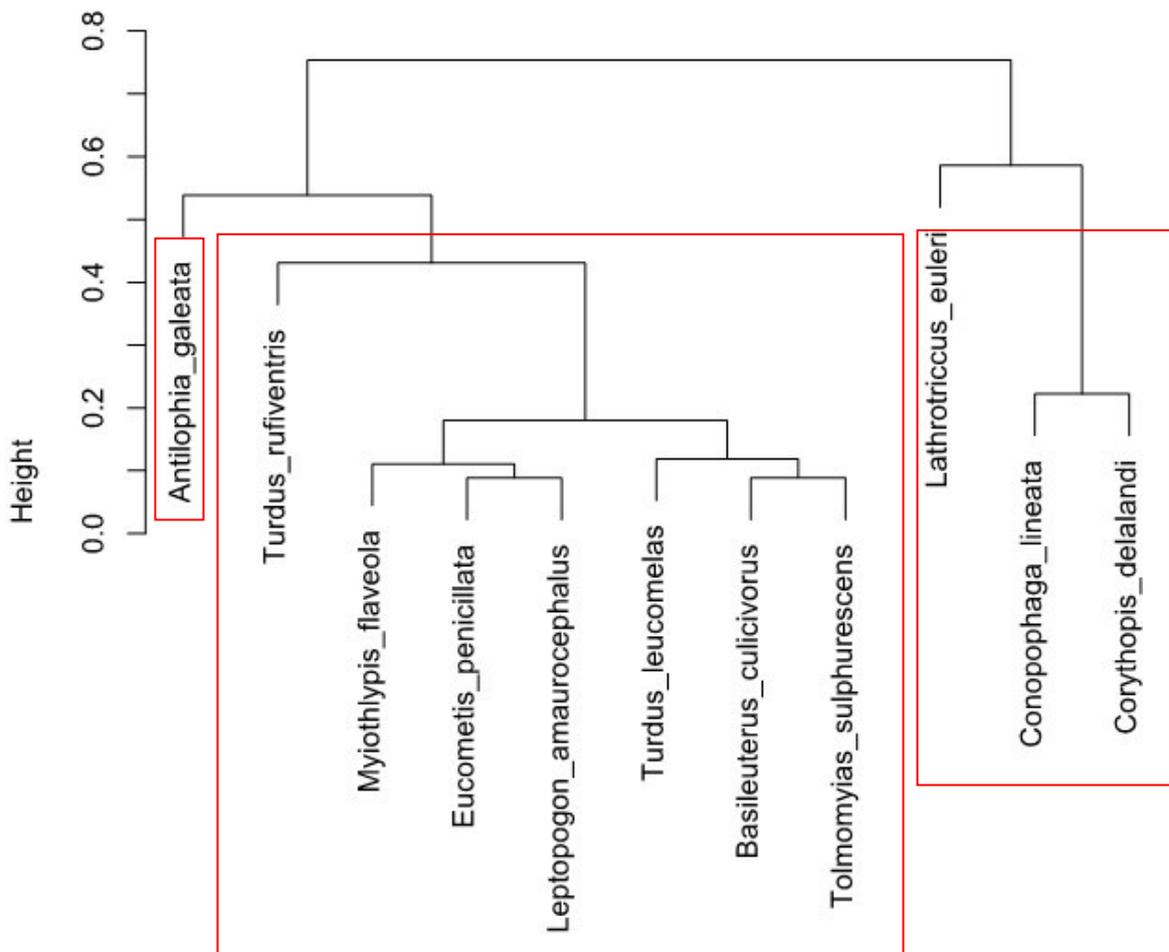


FIGURA 4: Dendrograma da Análise de Agrupamento de três grupos, delimitados em retângulos vermelhos, de espécies de Passeriformes capturados em ambientes florestais do Cerrado brasileiro.

## DISCUSSÃO

Identificar e descrever a ocorrência de danos nos núcleos de eritrócitos dos animais, pode fornecer informações relevantes a respeito do potencial impacto de fatores ambientais em populações naturais (BAOS et al., 2006). A utilização de ensaios com ANE's tem se

mostrado confiável para diferentes espécies de vertebrados, especialmente para aves (GONÇALVES et al., 2020; MAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2020; SANTOS et al., 2017; SOUZA et al., 2017). Gonçalves et al. (2020), em um estudo em cinco fragmentos de diferentes tamanhos e com diferentes interferências antrópicas, observou diferença na quantidade da anomalia do tipo eritroplástídeos entre as áreas, sendo maior em locais próximos ao ambiente urbano.

Entre as ANE's registradas nesse estudo, o tipo núcleo deslocado esteve presente em grande parte dos eritrócitos analisados, uma situação rara, porém já relatada na literatura (SOUZA et al. 2017). A identificação desse tipo de alteração ocorre pela visualização do núcleo rotacionado ou deslocado do centro da célula, em virtude de danos em estruturas, tais como microtúbulos, microfilamentos e/ou filamentos intermediários, durante a formação celular (SOUZA et al. 2017; MESAK et al. 2019). Souza et al. (2017) observaram, em um teste experimental, um maior número de eritrócitos com núcleos deslocados em periquitos australianos que foram expostas aos efluentes tratados com curtume, confirmando a hipótese de que poluentes podem causar efeitos citotóxicos nas células sanguíneas dos animais.

A segunda lesão mais encontrada foi o tipo núcleo entalhado, descrita por Carrasco et al. (1990), em um estudo com peixes coletados em áreas poluídas da costa da Califórnia, como sendo fendas que se estendem para dentro do envoltório nuclear. Esse tipo de anomalia esteve presente em 74% dos indivíduos analisados de Passeriformes de uma área protegida na Argentina, sendo o primeiro registro para esse grupo, confirmando a possibilidade dessa anomalia ser usada como biomarcador de danos genéticos e os registros obtidos serem referências para aves adultas, uma vez que os poluentes antropogênicos nessa região são considerados ausentes ou escassos (QUERO et al. 2016).

A anomalia do tipo eritroplástídeo, terceiro tipo mais registrado no nosso estudo, foi descrita por Lucas e Jamroz (1961) como sendo a ausência de núcleo nos eritrócitos. Tal lesão

também foi registrada por Clark et al. (2013) em 24 espécies de aves de 10 ordens, incluindo Passeriformes. No entanto, nenhum histórico ou dados clínicos referentes aos indivíduos analisados estavam disponíveis para possíveis comparações e inferências acerca da presença desse tipo de ANE. Além disso, Gonçalves et al. (2020) observaram a presença de eritroplastídeo em indivíduos de *Antilophia galeata* capturados em áreas florestais do Cerrado brasileiro, sendo que as áreas próximas ao ambiente urbano e com baixa qualidade do ar apresentaram maiores quantidades desse tipo de lesão, sugerindo o potencial de uso desta anomalia como biomarcador de estresse ambiental.

As alterações do tipo constrição assimétrica e simétrica foram definidas por Carrola et al. (2014), pela presença de um núcleo na forma de uma ampulheta com uma constrição, de tamanhos diferentes ou com partes do mesmo tamanho, respectivamente, em um estudo com peixes em ecossistemas com diferentes gradientes de poluição. Em aves, a anomalia constrição assimétrica foi o tipo evidenciado com maior frequência em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) expostas ao composto abamectina (FARIA et al., 2018), confirmando o potencial citotóxico do pesticida.

As células binucleadas, observadas por Jindal e Verma (2015) em um estudo experimental com peixes, são caracterizadas pela presença de dois núcleos principais, separados ou em contato, dentro de uma única célula, podendo ter tamanho e intensidade de coloração semelhantes. Em um estudo com aves capturadas, em uma reserva argentina de 46 mil de hectares entre os Andes e o Oceano Atlântico, esse tipo de anomalia, juntamente com o tipo núcleo entalhado, foi registrada em menor frequência (QUERO et al., 2016). Segundo esses autores, tal situação representa uma forma de determinar os valores de referência para algumas espécies de Passeriformes que também são encontradas em ambientes impactados pelo ser humano, possibilitando o uso desse tipo de ANE como técnica de avaliação da qualidade do ambiente. Na mesma direção, Souza et al. (2017) observaram, em um estudo

experimental com periquito australiano, a presença de um aumento significativo de células binucleadas, além de outros tipos como constrição simétrica e assimétrica, em machos e fêmeas expostas a poluição por efluentes de indústrias de curtume, confirmando a influência de compostos tóxicos na estabilidade do DNA.

A anomalia núcleo multilobulado, descrita por Jindal e Verma (2015) pela presença de várias evaginações no envoltório nuclear, foi a alteração com menor quantidade de registro, contrariando as observações de Santos et al. (2017). Em um estudo com *Ciconia ciconia* e *Ardea cinerea*, esses autores observaram que esse tipo de alteração foi a mais frequente, correspondendo a taxas entre 74,5 e 86,1% das anomalias marcadas, o que poderia estar relacionado a uma possível exposição a estressores abióticos (como produtos químicos disponíveis na água), provocando lesões no núcleo do DNA dos eritrócitos.

A existência de correlação linear entre os pares de tipos de ANE's registrados em nosso estudo pode ser explicada pelo processo de formação e desenvolvimento das anomalias. A formação de anomalias nos eritrócitos ocorre no momento da divisão celular, sendo resultado da quebra de cromossomos tanto em situações de má segregação destes quanto em lesões não reparadas ou mal reparadas (GUILHERME et al., 2008; SERRANO-GARCÍA; MONTERO-MONTOYA, 2001; STOIBER et al., 2004). Além disso, alguns autores apontam que as ANE's, como constrições simétrica e assimétrica, núcleo entalhado, núcleo deslocado e núcleo multilobulado podem ser precursoras de micronúcleos (MESAK et al., 2019; SHIMIZU et al., 1998; SHIMIZU; SHIMURA; TANAKA, 2000) ou de células binucleadas (MESAK et al., 2019).

No estudo de Quero et al. (2016), com algumas espécies de aves capturadas em uma reserva na Argentina, foi relatada uma correlação entre micronúcleo e núcleo entalhado. Além disso, em estudos experimentais com peixes, alguns autores (JINDAL; VERMA, 2015) relataram uma relação entre a frequência de micronúcleo e diferentes tipos de anomalias,

como núcleos entalhados. Esses estudos sugerem que o mecanismo de formação de um tipo de anomalia pode estar relacionado com a presença de outras alterações nucleares (QUERO et al., 2016), apesar dos mecanismos de formação das anomalias ainda não serem totalmente explicados (AZEVEDO; BRAGA; RIBEIRO, 2012; OLIVEIRA et al., 2020). Portanto, a análise quantitativa de ANE's, sem especificar o tipo, se demonstrou um método eficaz, uma vez que a maioria tipos de lesões apresentaram uma forte correlação, exceto núcleo multilobulado.

A ordenação e o agrupamento das espécies de aves, conforme o grau de susceptibilidade e a similaridade na proporção de amostras com anomalias, provavelmente estão relacionados à influência de fatores intrínsecos (espécie, comportamento migratório, dieta, abundância) ou extrínsecos (habitat, altitude), além de possíveis poluentes no ambiente (BAESSE et al., 2019; QUERO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2021). Diversos estudos com aves analisaram diferenças na quantidade de alterações nucleares (QUERO et al., 2016; SANTOS et al., 2017), indicando que esses números podem variar dependendo da espécie a ser analisada.

*Antilophia galeata* foi a espécie que apresentou alta susceptibilidade a desenvolver ANE's, ficando em um grupo separado das demais. É uma espécie dependente de ambiente florestal (MANHÃES; LOURES-RIBEIRO, 2011), com baixa capacidade de se deslocar em áreas abertas (ANCIÃES; MARINI, 2000; HANSBAUER et al., 2008), ficando restrita ao fragmento de origem. Além disso, é encontrada tanto em ambientes conservados (MARÇAL-JÚNIOR et al., 2009) quanto em locais com algum tipo de alteração antrópica (SILVA; MELO, 2011; BAESSE et al., 2015, 2019; GONÇALVES et al., 2020), ocupam áreas de vida maiores que 20ha durante a reprodução, sendo capaz de se reproduzir em diferentes tipos de habitat e inclusive em ambientes com distúrbios (MARÇAL; LOPES, 2019). Portanto, é possível que essas características contribuam para a alta susceptibilidade em apresentar

elevado número de ANE's, distinguindo-a dos outros grupos, corroborando para o uso como modelo em estudos de biomonitoramento.

*Turdus rufiventris*, *Eucometis penicillata*, *Tolmomyias sulphurescens*, *Leptopogon amaurocephalus*, *Basileuterus culicivorus*, *Myiothlypis flaveola* e *Turdus leucomelas* formaram um mesmo grupo. São espécies que apresentam o hábito de ficar no sub-bosque do interior da floresta, forrageando em estratos baixos (serrapilheira) (MARINI; CAVALCANTI, 1993; SAZIMA; D'ÂNGELO, 2011); com exceção de *T. leucomelas*, *T. sulphurescens* e *L. amaurocephalus* que também podem, ocasionalmente, ocupar estratos florestais superiores de acordo com a disponibilidade de itens alimentares no ambiente (VOGEL; ZAWADZKI; METRI, 2011). Sendo assim, essas espécies exploram microhabitats similares e conseqüentemente ficam expostas às mesmas condições, como concentração de gases poluentes, o que pode contribuir para a similaridade na proporção de amostras com anomalias.

*Lathrotriccus euleri*, *Corythopsis delalandi* e *Conopophaga lineata* pertencem ao mesmo grupo, sendo que aspectos referentes aos hábitos alimentares podem explicar tal agrupamento. Em relação a alimentação, são insetívoras, forrageando na serrapilheira ou com voos curtos nas folhagens (LIMA; MANHÃES, 2017; MONSERRAT et al., 2007), ficando expostas de forma similar a ação de compostos tóxicos durante o processo de biomagnificação ao longo da cadeia alimentar e de gases poluentes na atmosfera, o que pode estar relacionado à similaridade na proporção de amostras com ANE's.

*Lathrotriccus euleri*, *C. delalandi*, *C. lineata* e *T. rufiventris* apresentaram menor susceptibilidade ao desenvolvimento de anomalias. No estudo, foram as espécies que tiveram menor número de amostras. Silveira et al. (2021) chamam a atenção para o fato de que isso pode ser um reflexo das particularidades fisiológicas das espécies cujo número de amostras ou

células necessárias para encontrarmos valores significativos de ANE's podem ser muito maiores do que o analisado no estudo.

O biomonitoramento com populações de aves por meio da análise de ANE's é relevante para a gestão da qualidade ambiental, uma vez que as aves são extremamente sensíveis a mudanças no ambiente (QUERO et al., 2016; BAESSE et al. 2019). No entanto, mais estudos com ANE's em aves brasileiras devem ser realizados.

## CONCLUSÃO

Dentre os 11 tipos de anomalias nucleares eritrocitárias observadas em outros estudos com aves, tanto em ambiente natural quanto em testes experimentais, registramos sete tipos: célula binucleada, eritroplástico, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado. O núcleo deslocado foi o tipo de anomalia mais abundante nas amostras enquanto o núcleo multilobulado foi observado apenas quatro vezes e em quatro espécies.

Além disso, foi observada a existência de correlação linear entre os pares de tipos de ANE'S, com exceção da anomalia núcleo multilobulado. A evidência de correlação entre as alterações nucleares eritrocitárias pode estar relacionada com o mecanismo de formação e desenvolvimento de anomalias e permite que estudos futuros possam quantificar essas anomalias sem a necessidade da identificação de diferentes tipos.

A ordenação e o agrupamento das espécies de aves indicaram que as populações de *Antilophia galeata*, *Eucometis penicillata*, *Tolmomyias sulphurescens*, *Leptopogon amaurocephalus*, *Basileuterus culicivorus*, *Myiothlypis flaveola* e *Turdus leucomelas* podem ser utilizadas no biomonitoramento por meio da análise de ANE's, uma vez que foram espécies mais susceptíveis de apresentarem anomalias. No entanto, vale ressaltar que para essa análise é importante incluir outros aspectos, tais como: qualidade do ambiente, habitat,

número de células, amostras e comportamento das espécies investigadas, na tentativa de elucidar possíveis causas ou relações referentes à presença ou ausência de alterações ou danos no DNA.

O presente estudo pode ser um ponto de partida para investigações futuras a partir do uso de anomalias como biomarcador, na medida em que registrou diferentes tipos de alterações no núcleo dos eritrócitos de aves selvagens, além de correlações entre tais anomalias. Trata-se do primeiro relato descritivo para algumas espécies de aves encontradas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro.

## REFERÊNCIAS <sup>2</sup>

ANCIÃES, M.; MARINI, M. Â. The effects of fragmentation on fluctuating asymmetry in passerine birds of Brazilian tropical forests. **Journal of Applied Ecology**, v. 37, n. 6, p. 1013–1028, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00554.x>

AZEVEDO, J. S.; BRAGA, E. S.; RIBEIRO, C. A. O. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 3, p. 323–330, set. 2012.

BAESSE, C. Q. *et al.* Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, n. 1, p. 223–228, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>

BAESSE, C. Q. *et al.* Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. 1, p. 631–637, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>

BAOS, R. *et al.* Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 2794, 2006. <https://doi.org/10.1897/05-570R.1>

BARBOSA, A. *et al.* Pollution and physiological variability in gentoo penguins at two rookeries with different levels of human visitation. **Antarctic Science**, v. 25, n. 2, p. 329–338, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0954102012000739>

---

<sup>2</sup> Referências formatadas de acordo com a NBR 6023 (ABNT, 2018).

CAMPBELL, T. **Exotic animal hematology and cytology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 402p. 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118993705>

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990. <https://doi.org/10.1139/f90-237>

CARROLA, J. *et al.* Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 9, p. 6057–6068, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2537-0>

CLARK, P. Assessment of avian erythrocytes that exhibit variant nuclear morphology. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, n. 3, p. 485–490, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1926-6>

CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 184p. 2009.

CLARK, P.; HUME, A.; RAIDAL, S. R. Erythroplastidcytosis in a Major Mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 3, p. 539–542, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1711-y>

CORDUK, N. *et al.* Monitoring of micronuclei and nuclear abnormalities In Pelophylax ridibundus erythrocytes from the Biga Stream (Canakkale, Turkey). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 147–153, 2018.

FARIA, D. B. G. *et al.* Analysis of various effects of abamectin on erythrocyte morphology in Japanese quails (*Coturnix japonica*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2450–2456, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0677-8>

FRANCO, H. F. Amitose de eritroblastos e eritrocitos no sangue circulante de aves. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 38, n. 1, p. 73-79, 1943.

GHAFFAR, A. *et al.* Sodium arsenate and/or urea differently affect clinical attributes, hemato-biochemistry and DNA damage in intoxicated commercial layer birds. **Toxin Reviews**, v. 37, n. 3, p.206–215, 2018. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1342096>

GONÇALVES, V. F. *et al.* Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in *Antilophia galeata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 1, p. 44650–44655, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10057-y>

GUILHERME, S. *et al.* Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 3, p. 411–421, jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.08.016>

HANSBAUER, M. M. *et al.* Comparative range use by three Atlantic Forest understory bird species in relation to forest fragmentation. **Journal of Tropical Ecology**, v. 24, n. 3, p. 291–299, 2008. <https://doi.org/10.1017/S0266467408005002>

HARTMAN, F. A.; LESSLER, M. A. Erythrocyte Measurements in Birds. **The Auk**, v. 80, n. 4, p. 467–473, 1963. <https://doi.org/10.2307/4082852>

HUSSAIN, R. *et al.* Genotoxic and pathological effects of malathion in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 52, n. 4, p. 1143–1149, 2015.

JINDAL, R.; VERMA, S. *In vivo* genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, n. 1, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.005>

JONES, M. P. Avian Hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 649–659, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>

LIMA, A. L. C.; MANHÃES, M. A. Seasonal variation of understory insectivorous birds and arthropods in an area of secondary Atlantic Forest, southeast Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 25, n. 1, p. 47–53, 2017. <https://doi.org/10.1007/BF03544376>

LUCAS, A. M.; JAMROZ, C. **Atlas of Avian Hematology** Vol. 25. Washigton: United States Department of Agriculture, 1961.

MANHÃES, M. A.; LOURES-RIBEIRO, A. Avifauna da Reserva Biológica Municipal Poço D'Anta, Juiz de Fora, MG. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 275–286, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000300023>

MARÇAL, B. F.; LOPES, L. E. Breeding biology of the Helmeted Manakin *Antilophia galeata* in an ecotone between the Atlantic Forest and the Cerrado. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 27, n. 1, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1007/BF03544440>

MARÇAL-JÚNIOR, O. *et al.* Levantamento da avifauna na Reserva Ecológica do Panga (Uberlândia, MG, Brazil). **Bioscience Journal**, v. 25, n. 6, p. 149–164, 2009.

MARINI, M. Â.; CAVALCANTI, R. B. Habitat and foraging substrate use of three Basileuterus warblers from Central Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 69–76, 1993.

MAS, E. *et al.* Erythrocytic abnormalities in three Antarctic penguin species along the Antarctic Peninsula: biomonitoring of genomic damage. **Polar Biology**, v. 38, n. 7, p. 1067–1074, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1667-2>

MESAK, C. *et al.* Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 6, p. 6234–6243, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04155-9>

MITKOVSKA, V.; CHASSOVNIKAROVA, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 7, p. 7166–7176, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07408-9>

MONSERRAT, J. M. *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1–2, p. 221–234, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.012>

OLIVEIRA, J. S. P. *et al.* Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. **Science of The Total Environment**, v. 737, n. 1, p. 140304, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140304>

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 281–284, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300005>

QUERO, A. A. M. *et al.* Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 25224–25231, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7638-5>

SANTOS, C. S. A. *et al.* Assessment of DNA damage in *Ardea cinerea* and *Ciconia ciconia*: A 5-year study in Portuguese birds retrieved for rehabilitation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, n. 1, p. 104–110, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.039>

SAZIMA, I.; D'ÂNGELO, G. B. The Pale-breasted Thrush (*Turdus leucomelas*) preys on a gekkonid lizard and an anomalepidid snake. *Revista Brasileira de Ornitologia*. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 3, p. 450-452, 2011.

SCHMID, W. The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis. *In: Chemical Mutagens*. Boston, MA: Springer US, 1976. p. 31–53.

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 1, p. 38–45, 2001. <https://doi.org/10.1002/em.1048>

SHIMIZU, N. *et al.* Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 1307–1320, 1998. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1307>

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 1, p. 81–90, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00003-8)

SILVA, A. M.; MELO, C. Frugivory and seed dispersal by the Helmeted Manakin (*Antilophia galeata*) in forests of Brazilian Cerrado. **Ornitologia Neotropical**, v. 22, n. 1, p. 69–77, 2011.

SILVEIRA, E. D. R. *et al.* Micronucleus and different nuclear abnormalities in wild birds in the Cerrado, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, n. 0123456789, 4 out.

2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16845-4>

SOUTO, H. *et al.* Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 1, p. 24084–24092, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2466-4>

SOUZA, J. M. *et al.* A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. **Chemosphere**, v. 175, n. 1, p. 521–533, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.087>

STOIBER, T. *et al.* Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 563, n. 2, p. 97–106, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.06.009>

VOGEL, H. F.; ZAWADZKI, C. H.; METRI, R. Coexistência entre *Turdus leucomelas* Vieillot, 1818 e *Turdus rufiventris* Vieillot, 1818 (Aves: Passeriformes) em um fragmento urbano de floresta com araucárias, Sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 35–45, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000300002>

ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 5. ed. Pardesh (India): Pearson, 756p. 2013.

## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITOS DA QUALIDADE DO AR NA OCORRÊNCIA DE ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS EM AVES DO CERRADO BRASILEIRO**

## **Resumo**

O processo de urbanização e a expansão de áreas de cultivo agrícola impactam na qualidade do ar na medida em que provocam um acúmulo de poluentes, afetando os seres vivos. Para entender os efeitos dos poluentes no ambiente utilizam-se técnicas de biomonitoramento, como a análise de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em aves. O objetivo desse estudo foi analisar a quantidade ANE's em aves de ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar, testando a hipótese de que indivíduos encontrados em locais com maior exposição à poluição atmosférica apresentam maiores quantidades de ANE's. Para isso foram realizadas capturas de aves durante os meses de junho de 2013 a novembro de 2019, em seis áreas de florestas estacionais semidecíduais do Cerrado Mineiro. As áreas foram classificadas em três grupos, de acordo com o nível de qualidade do ar. Após as capturas, as aves foram identificadas e marcadas com anilhas metálicas; em seguida, foi feita a coleta de sangue para confecção de esfregaços sanguíneos que foram analisados com o auxílio de microscópio ótico. Foram analisadas 633 amostras de cinco espécies da ordem Passeriformes, sendo 46,9% das amostras apresentaram pelo menos uma célula com alguma ANE's. A porcentagem de amostras com ANE's variou de 26,0% nos ambientes com boa qualidade do ar a 84,4% em locais com má qualidade do ar. O modelo de Regressão de Poisson indicou que a quantidade de ANE's foi influenciada pelo nível de qualidade do ar, sendo que as cinco espécies estudadas exibiram um aumento na frequência de ANE's com o aumento da taxa de concentração de monóxido de carbono (CO). O nível de qualidade do ar foi um previsor estatisticamente significativo no desenvolvimento das anomalias, explicando 88% da variação entre os indivíduos amostrados. Esses resultados sugerem que estudos com análises de ANE's podem ser úteis e valiosos para avaliar a qualidade ambiental, baseada em situações de estresse, como no caso da poluição atmosférica.

Palavras-chave: alterações celulares; avifauna; poluição atmosférica.

## **Effects of air quality on the occurrence of erythrocyte nuclear abnormalities in birds from the Brazilian Cerrado**

### **Abstract**

Urbanization and agriculture expansion change air quality due to the accumulation of pollutants, which affects free living organisms. Biomonitoring techniques, such as the analysis of Erythrocyte Nuclear Abnormalities (ENAs) are used to assess the effects of these pollutants in birds. In this study, we aimed to assess the quantity of ENAs in birds from areas with different levels of atmospheric pollution. Specifically, we tested the hypothesis that birds from areas with higher concentration of air pollutants have also a higher number of ENAs. For that purpose, we captured birds in six semideciduous forests from the Cerrado of the State of Minas Gerais in Brazil, from June 2013 to November 2019. Each area was classified into three groups according to its level of air quality. After they were captured, birds were identified and tagged with metal bands; then, we collected blood to prepare blood smears, which were assessed in optical microscope. We analyzed 663 blood samples from five species of the order Passeriformes. Almost half (46.9%) of the samples had at least one cell with ENA. The occurrence of ENAs varied from 26.0% in areas with good air quality to 84.4% in areas with bad air quality. The Poisson Regression model showed that air quality was a good predictor (88.0%) of the quantity of ENAs in birds' cells, and all five species showed an increase in the frequency of ENAs when the concentration of CO in the atmosphere was higher. These findings indicate that studies of ENAs in birds may be useful to assess how different human disturbances, such as atmospheric pollution, may affect environmental quality.

Keywords: cell alterations; avifauna, atmospheric pollution.

## INTRODUÇÃO

O aumento das atividades antrópicas, como a urbanização e a expansão de áreas de cultivo, tem ocasionado o acúmulo de componentes químicos potencialmente tóxicos no ambiente, impactando na qualidade do ar e, conseqüentemente, na vida como um todo (BARKER; TINGEY, 1992; RAWAT; AGARWAL, 2015). Assim sendo, os organismos e as comunidades biológicas são afetados de diferentes formas, podendo ocorrer mutações, alteração na diversidade ou extinção de espécies da fauna e flora presentes nesses ambientes (BAESSE et al., 2015; GONÇALVES et al., 2020; RAWAT; AGARWAL, 2015; SANTOS et al., 2017).

O uso de métodos de biomonitoramento é uma opção para entender os efeitos de vários poluentes sobre os seres vivos (BAOS et al., 2006; FARIA et al., 2018; KOCH et al., 2016; SILVEIRA et al., 2021). Segundo Markert, Breure e Zechmeister (2003), biomonitores são organismos ou comunidade de organismos que possibilitam o acesso à informações sobre os aspectos quantitativos da qualidade do ambiente. Os seres vivos podem ser classificados como monitores por acumularem um ou mais elementos ou compostos provenientes do ambiente, apresentando efeitos nas estruturas morfológica, histológica, celular; nos processos metabólicos; no comportamento e/ou na estrutura populacional, e, conseqüentemente, podem refletir o estado de conservação ou estresse de um ambiente (KOCH et al., 2016). Nesse contexto, as aves podem ser utilizadas para fornecer informações a respeito da qualidade dos ecossistemas, uma vez que são encontradas em diferentes ambientes (BAESSE et al., 2015; GONÇALVES et al., 2020; QUERO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2021).

As Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) são exemplos de biomarcadores (medidas de parâmetros biológicos em consequência da interação entre o composto tóxico e o organismo) usados com frequência para avaliar o potencial efeito de xenobióticos (substância estranha ao organismo) em aves (GÓMEZ-MEDA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2020; MAS et al., 2015; QUERO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2021; SOUTO et al., 2018). As

ANE's são alterações genéticas, causadas por compostos tóxicos (MAS et al., 2015) em indivíduos que permanecem nos ambientes sob efeitos de agentes genotóxicos (MITKOVSKA; CHASSOVNIKAROVA, 2020; SERRANO-GARCÍA; MONTERO-MONTOYA, 2001; SOUZA et al., 2017). O núcleo dos eritrócitos das aves auxilia na produção de energia e nas atividades metabólicas da célula e a presença de alguma anomalia pode estar relacionada com doenças hematológicas, como anemia e hemoparasitismo e com a presença de compostos tóxicos no sangue (CLARK; HUME; RAIDAL, 2013).

Dentre as ANE's identificadas em aves tem-se: célula binucleada, eritroplástideo, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado (CLARK; RAIDAL, 2014; QUERO et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Quero et al. (2016) registraram frequências significativas de núcleos entalhados, em *Saltator aurantirostris* e *Columbina picui*, no deserto central do Monte na Argentina. Souza et al. (2017) em um estudo pioneiro com periquitos australianos registraram um maior número de anomalias nucleares em machos e fêmeas expostos ao poluente (efluente tratado com curtume).

Desta forma, analisar a quantidade de ANE's em aves de vida livre em ambientes com diferentes graus de antropização pode representar uma importante estratégia para estudos de biomonitoramento. Neste sentido, a hipótese do estudo foi de que aves encontradas em locais com maior exposição à poluição atmosférica apresentam maiores quantidades de ANE's.

## **METODOLOGIA**

### ***Áreas de estudo***

O estudo foi realizado em seis áreas de florestas estacionais semidecíduais no Cerrado brasileiro: Mata da Fazenda Água Fria, Mata da Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Mata da Fazenda Experimental do Glória – UFU, Mata da Fazenda São José, Mata do Parque do Sabiá e Mata do Parque Municipal Victorio Siquierolli (Figura 1). A

qualidade do ar foi determinada pela avaliação da taxa de concentração de monóxido de carbono, medida em ppb (partes por bilhão), para cada fragmento, disponível na base de dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE (INPE, 2020). Os fragmentos foram classificados e agrupados em uma escala de 1 a 3, sendo: 1= boa qualidade do ar (0 a 250 ppb); 2= qualidade do ar moderada (250 a 500 ppb) e 3= má qualidade do ar (500 a 750 ppb), conforme Gonçalves et al. (2020).

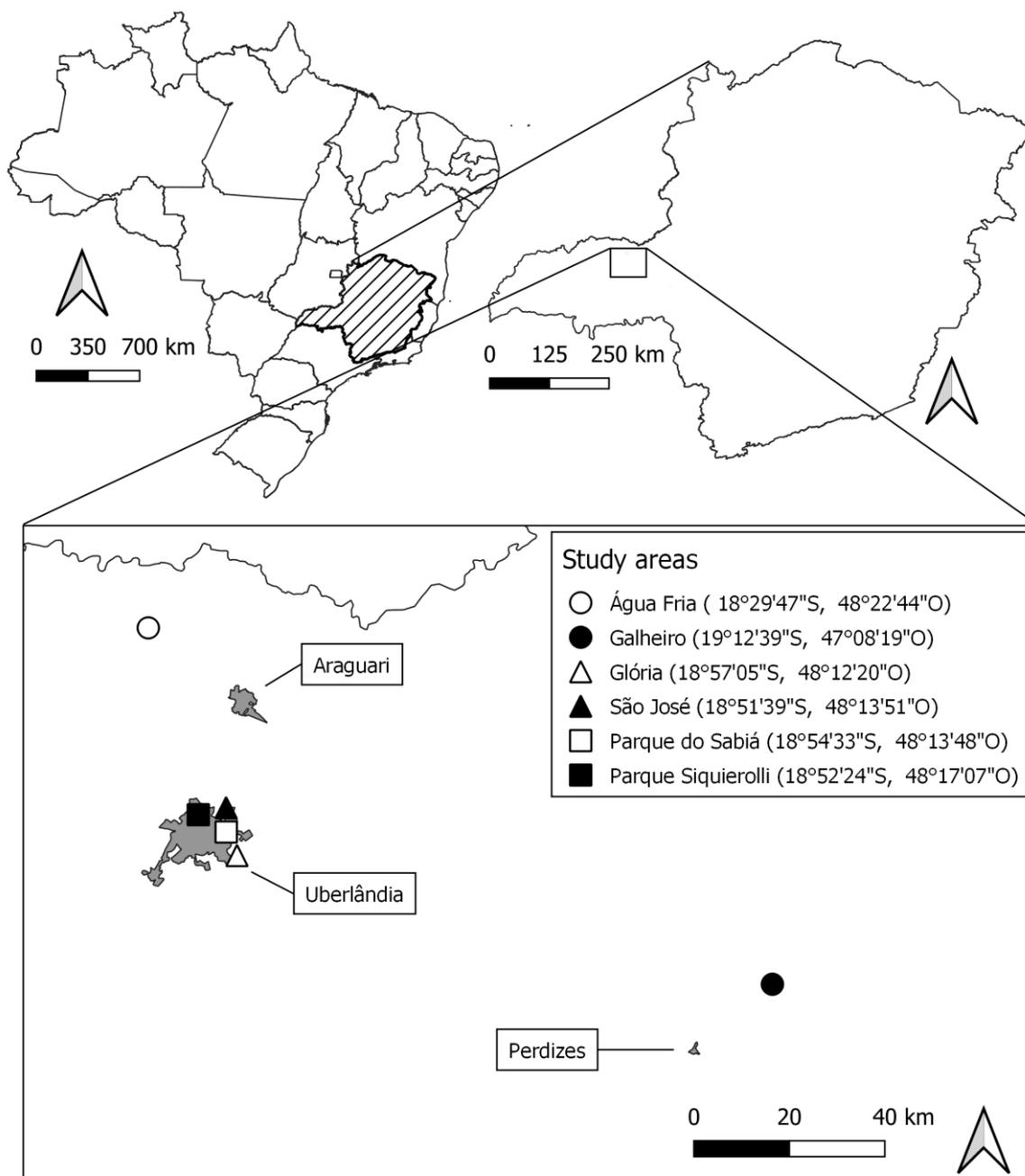


FIGURA 1: Mapa com a localização das áreas de estudo com diferentes níveis de qualidade do ar, sendo que os círculos representam áreas com boa qualidade do ar; os triângulos as áreas com qualidade do ar moderada e os quadrados, má qualidade do ar. Elaborado por: Vítor Carneiro de Magalhães Tolentino.

### ***Coleta de dados***

As aves foram capturadas com redes de neblina durante quatro dias por campanha entre junho de 2013 e novembro de 2019, totalizando quatro campanhas em cada estação (seca e chuva) por área. Após a captura, as aves foram marcadas com anilhas de metal (CEMAVE / Padrão ICMBio Projeto 3730, Registro 359076). Em seguida, foram realizadas coletas de sangue com agulhas descartáveis (0,8x0,3 mm) inseridas na veia metatársica dos indivíduos capturados (SISBIO/ICMBio – Autorização: 44901). O sangue foi gotejado diretamente em lâminas para a confecção dos esfregaços sanguíneos e identificados com o número da anilha da ave correspondente.

Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol (BAESSE et al., 2015, 2019; SCHMID, 1976), corados com solução de GIEMSA 5% e tampão fosfato (BAESSE et al., 2019; PALHARES; GRISOLIA, 2002), lavados com água destilada, secos à temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas seguindo o modelo *zig-zag* com auxílio de microscópio ótico (Nikon Eclipse E200) com objetiva de 100x (BAESSE et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020). Para análise da quantidade de ANE's foi feita a observação de 5000 eritrócitos por indivíduo.

Os indivíduos que foram recapturados em um intervalo mínimo de 45 dias foram incluídos e tiveram os esfregaços analisados, sendo cada recaptura considerada uma nova unidade amostral, isto porque as aves renovam os seus eritrócitos em um período de 25 a 45 dias (JONES, 2015). Para a análise dos esfregaços foram consideradas as espécies que tiveram um número mínimo de cinco indivíduos amostrados em cada uma das áreas de estudo (QUERO et al., 2016) e que apresentaram susceptibilidade no desenvolvimento de ANE's, conforme observado no capítulo 1. As amostras provenientes de indivíduos com mudas de penas e/ou infecções por ectoparasitas foram descartadas, afim de padronizar a amostragem.

Portanto, cada amostra corresponde a 5000 eritrócitos analisados para cada indivíduo que atendeu aos requisitos para inclusão no universo amostral.

### ***Análises estatísticas***

Para as análises estatísticas foi considerado o número total de alterações por amostra, sem distinção entre os tipos de ANE's, uma vez que foi observada a existência de correlação significativa entre os pares de ANE's: célula binucleada, eritroplástico, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado, conforme análises realizadas em estudo descrito no capítulo 1.

Para inspecionar a distribuição da variável dependente (número de ANE's por amostra) foi construído um histograma e aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Por meio do teste de Shapiro-Wilk foi possível observar que o número de ANE's por amostra, conforme esperado para dados de contagem, não apresentou distribuição normal em nenhum dos níveis de qualidade do ar.

Em seguida, foram feitas análises exploratórias para avaliar a influência das variáveis massa corporal, nível de qualidade do ar e espécie na ocorrência de ANE's. A influência da massa corporal foi investigada por meio do teste de Correlação de Spearman e a quantidade de ANE's por amostra em locais com diferentes níveis de qualidade do ar e nas diferentes espécies de aves foi comparada usando o teste de Kruskal-Wallis.

Para analisar a variação no número de ANE's foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson (Regressão de Poisson), uma vez que os dados representam contagens. Os modelos foram ajustados sobre os dados agrupados, representados pela soma do número de anomalias (variável resposta) por espécie e nível de qualidade do ar e as variáveis preditoras foram selecionadas por meio da análise dos desvios (*deviance*). Como o número de indivíduos variou entre as espécies amostradas, o logaritmo do número total de indivíduos analisados em cada grupo foi utilizado como offset nos modelos (ZUUR; HILBE;

LENO, 2013). Para construir e comparar os modelos incluindo diferentes combinações das variáveis preditoras, usamos as funções “glm” (especificando a família “poisson”), “summary” e “anova” (com o argumento test = “Chisq”), do R básico (*R Development Core Team 2019*), sendo as análises conduzidas em nível de significância de  $p < 0,05$  (ZAR, 2013).

A partir do modelo de Regressão de Poisson (selecionado a partir do critério AIC - Critério de Informação de Akaike), foi calculada a estatística pseudo- $R^2$  ( $R^2 = 1 - \text{desvio do modelo ajustado} / \text{desvio do modelo nulo}$ ) e o Risco Relativo ( $RR(x) = e^{\beta x}$ ), conforme descrito por Tadano, Ygaya e Franco (2009). A análise gráfica do ajuste do modelo foi realizada plotando: (1) os desvios residuais em função dos valores ajustados, sendo que os desvios devem ficar o mais próximo possível de zero no intervalo entre -2 e 2, e (2) os valores observados da variável resposta em relação aos valores ajustados pelo modelo, conforme Tadano, Ugaya e Franco (2009).

## RESULTADOS

Foram analisadas 633 amostras de cinco espécies da ordem Passeriformes (*Antilophia galeata*, *Basileuterus culicivorus*, *Eucometis penicillata*, *Leptopogon amaurocephalus*, *Myiothlypis flaveola*), nas quais foram registradas 297 (46,9%) amostras com pelo menos uma célula apresentando alguma ANE's (Tabela 1). Todas as cinco espécies tiveram mais de 40% das amostras com pelo menos algum tipo de anomalia, sendo que *L. amaurocephalus* e *A. galeata* foram as espécies que apresentaram a maior porcentagem de amostras com ANE's, com 53,4% (47) e 48% (110), respectivamente (Tabela 1). A menor média do número de ANE's por amostra foi de 0,757 ( $\pm 1,942$ ) em *B. culicivorus* e a maior, de 1,332 ( $\pm 2,023$ ), em *A. galeata* (Tabela 1).

TABELA 1: Porcentagem de amostras (%), valores das médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrão (DP) de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em amostras de sangue de cada espécie de ave capturada em ambientes florestais do Cerrado brasileiro.

Espécie	Número de amostras	% de amostras com ANE's (n)	$\bar{x}$ (DP) do número de ANE's por amostra
<i>Antilophia galeata</i>	229	48 (110)	1,332 (2,023)
<i>Basileuterus culicivorus</i>	107	42 (45)	0,757 (1,942)
<i>Eucometis penicillata</i>	82	45,1 (37)	1,256 (1,942)
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	88	53,4 (47)	1,273 (1,645)
<i>Myiothlypis flaveola</i>	127	45,7 (58)	0,968 (1,309)
Total	633	46,9 (297)	1,144 (1,718)

A porcentagem de amostras com ANE's variou de 26,0% nos ambientes com boa qualidade do ar a 84,4% nos ambientes com má qualidade do ar, com média (desvio padrão) do número de ANE's por amostra de 0,382 (0,798) nos locais com boa qualidade do ar e 2,700 (2,030) naqueles de má qualidade (Tabela 2).

TABELA 2: Porcentagem de amostras (%), valores das médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrão (DP) em amostras de sangue de aves capturadas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro com diferentes níveis de qualidade do ar: 1= boa qualidade do ar; 2= qualidade do ar moderada; 3= má qualidade do ar.

Nível de qualidade do ar	Número de amostras	Porcentagem de amostras com ANE's (n)	$\bar{x}$ (DP) do número de ANE's por amostra
1	246	26,0 (64)	0,382 (0,798)
2	297	52,9 (157)	1,303 (1,815)
3	90	84,4 (76)	2,700 (2,030)

Ao realizar as análises exploratórias não foi encontrada correlação significativa entre a biomassa das aves e a quantidade de ANE's por amostra ( $r_s = 0,035$ ;  $n = 633$ ;  $p = 0,385$ ), nem diferenças significativas na quantidade de ANE's por amostra entre as espécies (*Kruskal-Wallis chi-squared* = 5,300;  $df = 4$ ;  $p = 0,258$ ). No entanto, ao analisarmos as espécies agrupadas, foi encontrada diferença significativa entre a quantidade de ANE's por amostra em aves capturadas em ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar (*Kruskal-Wallis chi-squared* = 138,09;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ), sendo maior em locais com maiores concentrações de monóxido de carbono (baixa qualidade do ar) (Figura 2).

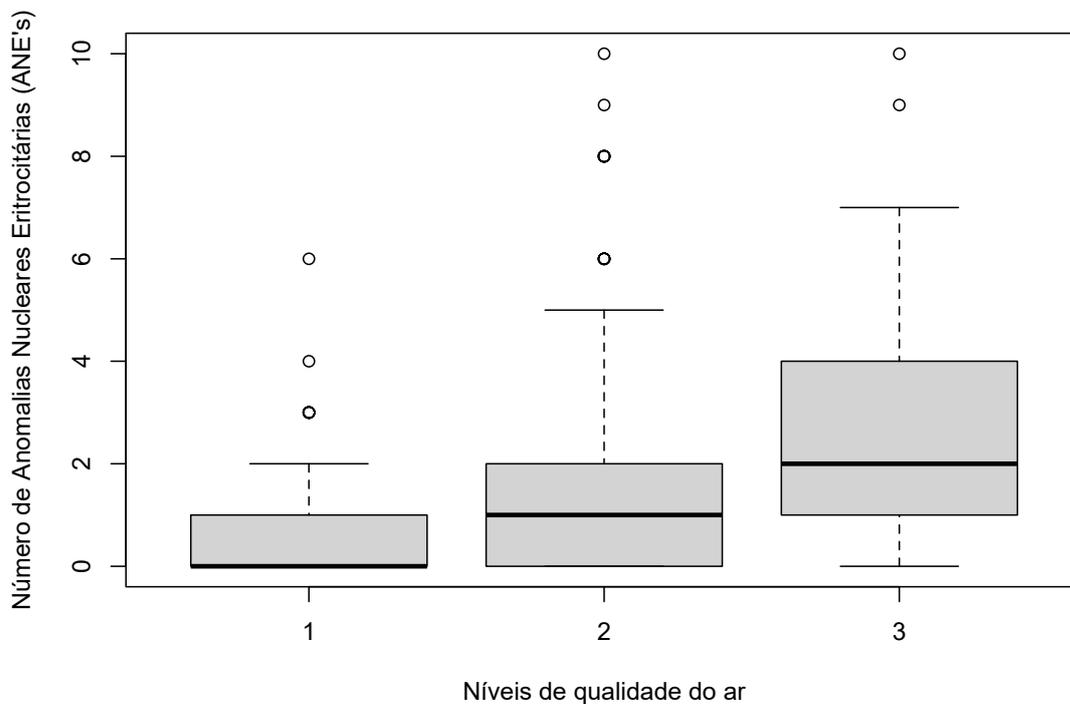


FIGURA 2 (continuação): Comparação entre o número observado de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) por amostras de sangue de aves ( $N = 633$ ) capturadas em ambientes florestais do Cerrado brasileiro com diferentes níveis de qualidade do ar (INPE) (1= boa qualidade do ar; 2= qualidade do ar moderada; 3= baixa qualidade do ar).

O modelo de Regressão de Poisson indicou que a quantidade de ANE's em amostras de sangue de aves capturadas no Cerrado brasileiro foi influenciada pelo nível de qualidade

do ar ( $p < 0,0001$ ), sem distinção entre as espécies ( $p = 0,8311$ ). As cinco espécies exibiram um aumento na frequência de anomalias nucleares eritrocitárias com o aumento da taxa de concentração de monóxido de carbono (Figura 3). O nível de qualidade do ar é um previsor estatisticamente significativo no desenvolvimento dessas alterações em Passeriformes (Tabela 3), explicando 88% ( $R^2 = 1-7,053/58,34$ ) da variação entre os indivíduos amostrados. Além disso, foi observado que, nos ambientes com os níveis de qualidade do ar 2 e 3, os coeficientes de estimativa apresentaram valores positivos, sendo 0,709 e 1,1774, respectivamente, indicando que em relação aos ambientes com nível 1, houve um aumento na frequência de alterações no núcleo dos eritrócitos (Tabela 3). O Risco Relativo de apresentar ANE's aumenta 2,03 vezes ( $RR = e^{0,709}$ ) em locais com qualidade do ar moderada e 3,24 vezes ( $RR = e^{1,1774}$ ) em locais com má qualidade do ar.

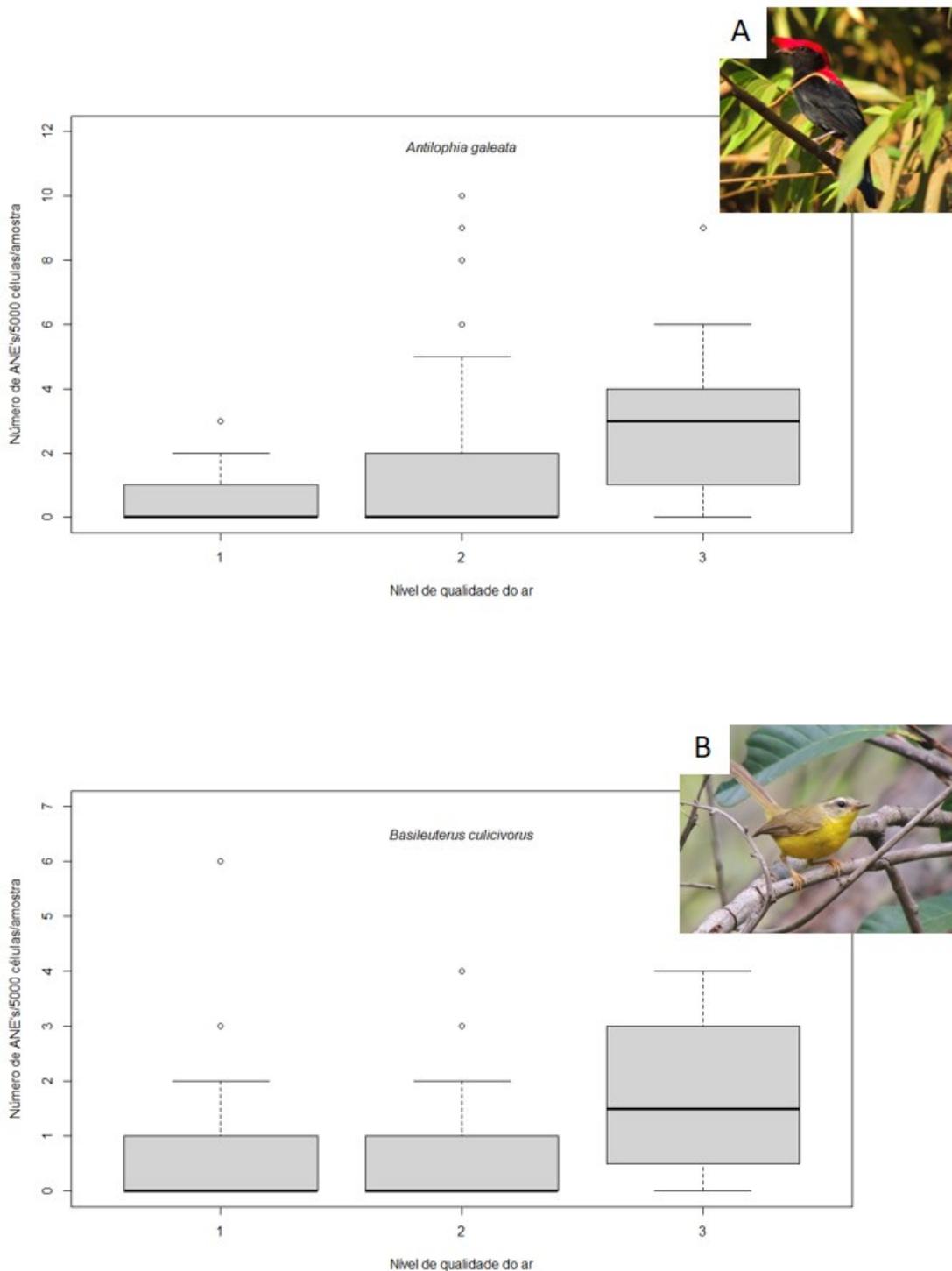


FIGURA 3: Variação no número de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em amostras de sangue de cinco espécies de aves capturadas em ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar. Espécies: A= *Antilophia galeata* (macho); B= *Basileuterus culicivorus*; C= *Eucometis penicillata*; D= *Leptopogon amaurocephalus*, E= *Myiothlypis flaveola*. Qualidade do ar: 1=boa qualidade do ar; 2= qualidade do ar moderada; 3= baixa qualidade do ar (INPE). Fotos das aves: Vítor Carneiro de Magalhães Tolentino.

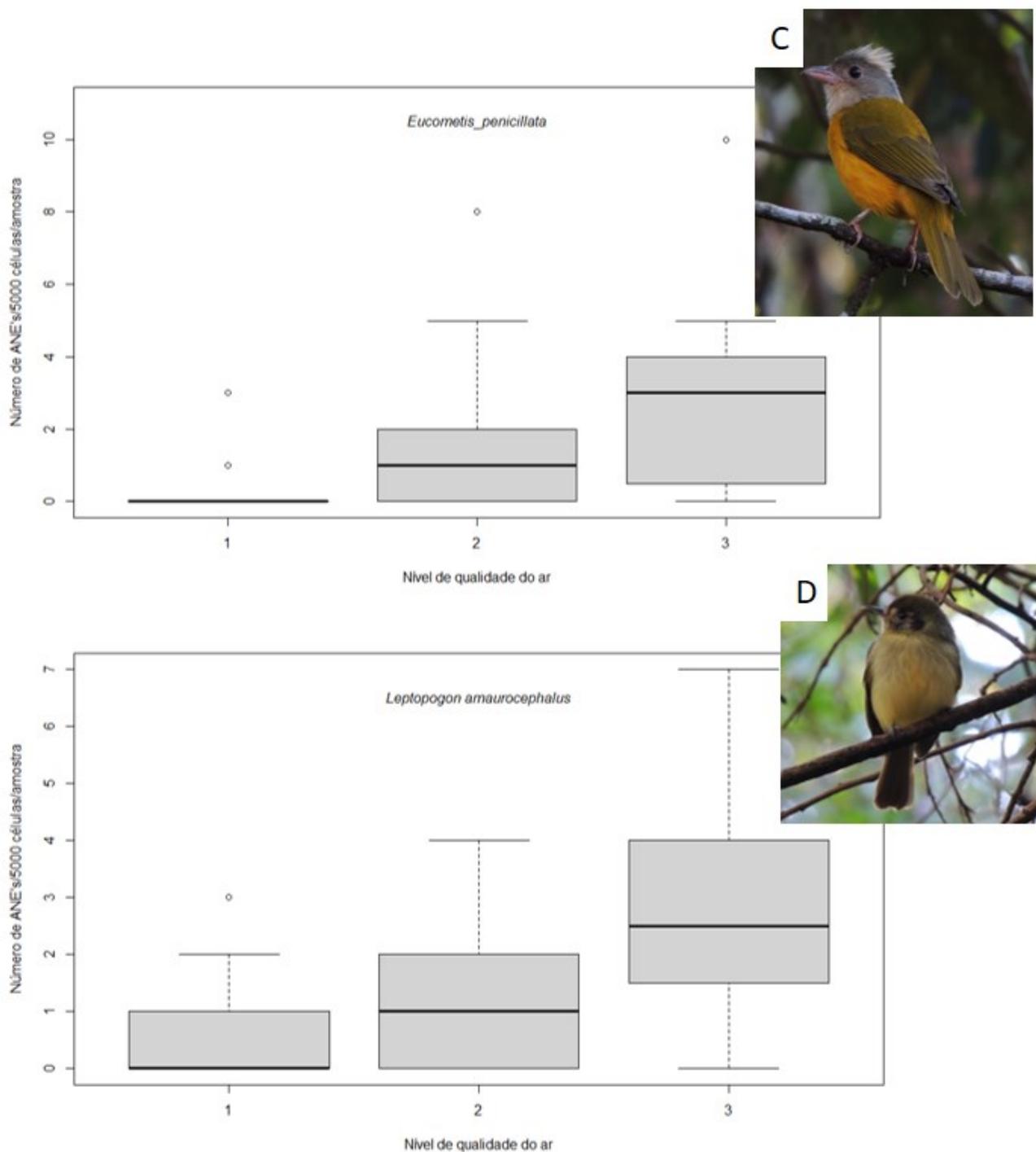


FIGURA 3 (continuação): Variação no número de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em amostras de sangue de cinco espécies de aves capturadas em ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar. Espécies: A= *Antilophia galeata* (macho); B= *Basileuterus culicivorus*; C= *Eucometis penicillata*; D= *Leptopogon amaurocephalus*, E= *Myiothlypis flaveola*. Qualidade do ar: 1=boa qualidade do ar; 2= qualidade do ar moderada; 3= baixa qualidade do ar (INPE). Fotos das aves: Vítor Carneiro de Magalhães Tolentino.

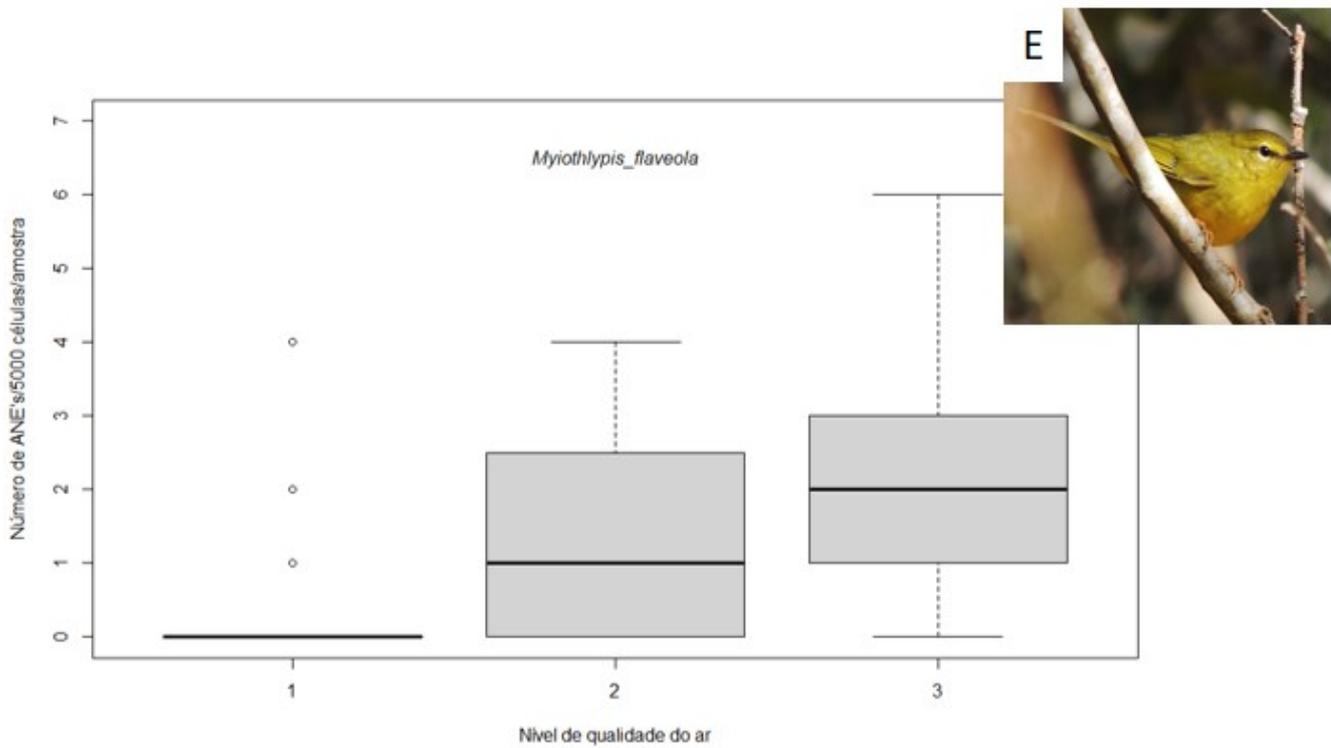


FIGURA 3 (continuação): Variação no número de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em amostras de sangue de cinco espécies de aves capturadas em ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar. Espécies: A= *Antilophia galeata* (macho); B= *Basileuterus culicivorus*; C= *Eucometis penicillata*; D= *Leptopogon amaurocephalus*, E= *Myiothlypis flaveola*. Qualidade do ar: 1=boa qualidade do ar; 2= qualidade do ar moderada; 3= baixa qualidade do ar (INPE). Fotos das aves: Vítor Carneiro de Magalhães Tolentino.

TABELA 3: Estimativas dos parâmetros do modelo log-linear de Poisson considerando a variação na quantidade de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em amostras de sangue de aves capturadas em ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar (2= qualidade do ar moderada; 3= baixa qualidade do ar). \*O nível 1 foi tomado como fator de referência.

	Estimativa	Erro padrão	Valor z	p
Intercepto (quantidade de ANE's nos ambientes com qualidade do ar 1)	1,3464	0,125	-10,77	2,0x10 <sup>-16</sup>
Qualidade do ar*				
2	0,709	0,1483	4,78	1,75x10 <sup>-6</sup>
3	1,1774	0,1697	6,94	3,93x10 <sup>-12</sup>
Grau de liberdade				
Desvio nulo	58,34	14		
Desvio residual	7,053	12		

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a investigar a relação entre a qualidade do ar e a frequência de ANE's em células de aves silvestres do Cerrado brasileiro. Estudos correlacionando animais silvestres e anomalias são escassos e em aves são praticamente inexistentes (GÓMEZ-MEDA et al., 2006; SANTOS et al., 2017; SCHILDERMAN et al., 1997). Silveira et al. (2021) relatam que a maioria das investigações de alterações nucleares nos eritrócitos de aves silvestres são focadas na análise de um tipo de anomalia, o micronúcleo, além de serem incipientes, com apenas seis estudos no Brasil, correspondendo a 2,87% da avifauna brasileira investigada e 5,03% das aves do Cerrado. Apenas um estudo no Brasil analisou um outro tipo de anomalia, o eritroplástídeo, em aves silvestres (GONÇALVES et al., 2020).

Além disso, grande parte dos estudos com ANE's tem usado experimentos laboratoriais com a oferta de compostos tóxicos, como o de Gómez-Meda (2006) que observou a indução de botões nucleares, outro tipo de anomalia, em indivíduos de *Aratinga*

*canicularis* inoculados com uma substância tóxica, a mitomicina C; o de Hussain et al. (2012) que mostraram o efeito da atrazina em doses mais altas em mudanças no núcleo dos eritrócito, e o de Sampaio et al. (2019), que registrou um aumento no número de anomalias em células sanguíneas de *Coturnix coturnix japonica* expostas aos efluentes oriundos de indústrias de curtume.

No nosso estudo foram registradas 297 amostras com pelo menos algum tipo de alteração nuclear, o que correspondeu a 46,9% das amostras, porcentagem similar à encontrada em outras investigações com aves silvestres. Por exemplo, em um estudo, realizado em quatro fragmentos florestais com distâncias variadas em relação ao ambiente urbano no Cerrado, foram encontradas um total de 369 amostras com micronúcleo, equivalente a 52% do total (BAESSE et al., 2019). Já em uma pesquisa em nove fazendas de café, inseridas no Cerrado mineiro, foi registrado quase 83% de espécies de aves com a presença de micronúcleo (SOUTO et al., 2018). Sendo assim, apesar da maioria dos estudos ficarem restritos à análise de micronúcleos, os resultados demonstram a presença de anomalias em células sanguíneas de aves silvestres.

A frequência de amostras com ANE's variou entre os ambientes com diferentes níveis de qualidade do ar, sendo maior nos locais mais poluídos. Baesse et al. (2015) relataram que aves encontradas em fragmentos florestais do Cerrado próximos a um ambiente urbano apresentaram uma frequência de micronúcleo seis vezes maior em comparação com fragmentos distantes da influência urbana. Martínez-Haro et al. (2017), em um estudo com coruja-buraqueira em três municípios do México, registraram uma maior frequência de micronúcleos no ambiente com alterações antrópicas. Além disso, Souto et al. (2018) observaram uma frequência média de micronúcleos quatro vezes maiores em aves encontradas próximas as grandes fazendas de café quando comparadas às pequenas fazendas,

devido a uma maior dispersão de pesticidas pulverizado de forma manual e/ou mecânica em grandes áreas de plantio.

A quantidade de anomalias nucleares, observadas nas amostras de sangue das aves neste estudo, foi influenciada pelo nível de qualidade do ar, sem distinção entre características intrínsecas das espécies, como biomassa. Diversos trabalhos com aves avaliam a diferença no número de alterações em células em relação a espécie, indicando que este o número pode variar também de acordo com a guilda, a biomassa ou o estrato de forrageamento da espécie (BAESSE et al., 2015, 2019; HUSSAIN et al., 2012; QUERO et al., 2016; SANTOS et al., 2017; SILVEIRA et al., 2021; SOUTO et al., 2018). No entanto, em um estudo recente, desenvolvido por Silveira et al. (2021), não foi observada diferença no total de ANE's entre espécies e guildas de aves capturadas em diferentes ambientes, corroborando com as observações do nosso estudo.

As populações de *Antilophia galeata*, *Basileuterus culicivorus*, *Eucometis penicillata*, *Leptopogon amaurocephalus*, *Myiothlypis flaveola* apresentaram média elevada de ANE's em ambientes com má qualidade do ar. Baesse et al. (2019) registraram um aumento no número médio de eritrócitos com micronúcleos nas populações de *A. galeata*, *B. culicivorus*, *E. penicillata* e *M. flaveola* capturadas em áreas próximas à área urbana, demonstrando relação com a poluição do ar. As cinco populações analisadas no nosso estudo fazem parte da ordem Passeriformes, com alimentação baseada, principalmente, em frutos e insetos e com hábito de forragear e deslocar pelo sub-bosque do interior dos fragmentos florestais (ANCIÃES; MARINI, 2000; MANHÃES; LOURES-RIBEIRO, 2011; MARINI; CAVALCANTI, 1993; PULGARÍN-R et al., 2018). Nesse sentido, os dados apresentados no nosso estudo sugerem que qualquer uma das espécies citadas pode ser usada como biomonitor da qualidade do ambiente, por meio da análise de ANE's, uma vez que houve um aumento na frequência das

anomalias associado ao aumento da taxa de concentração de monóxido de carbono (baixa qualidade do ar), independente da espécie.

O nível de qualidade do ar foi responsável por explicar 88% da variação de ANE's entre os Passeriformes analisados no estudo. As áreas classificadas com moderada e má qualidade do ar estão próximas ou inseridas ao ambiente urbano, sendo que esses locais tendem a ter maiores concentrações de compostos tóxicos no ar, como monóxido de carbono, no ar devido aos gases liberados por veículos automotores e indústrias (SCHILDERMAN et al., 1997). As aves são extremamente sensíveis às alterações ambientais (QUERO et al., 2016), uma vez que apresentam a capacidade de acumularem ar nos sacos aéreos, o que contribui para a absorção desses poluentes disponíveis no ambiente (BAESSE et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020; GONZÁLEZ-ACEVEDO et al., 2016; SOUTO et al., 2018). Sendo assim, substâncias tóxicas presentes nos ambientes mais poluídos podem ser responsáveis pela maior frequência de ANE's em aves silvestres, como micronúcleos (BAESSE et al., 2015, 2019; SILVEIRA et al., 2021; SOUTO et al., 2018) e eritroplástídeos (GONÇALVES et al., 2020).

Mas et al. (2015) observaram ANE's do tipo micronúcleo, núcleo entalhado, núcleo multilobulado, célula binucleada e botão nuclear em três espécies de pinguins na Antártica, refletindo a exposição aos diversos fatores, como poluentes, gerando dano genômico durante a formação dos eritrócitos. González-Acevedo et al. (2016), em um estudo com a espécie *Columba livia*, observaram que os indivíduos encontrados em praças e parques urbanos do México apresentaram um aumento significativo no número de micronúcleos quando comparados aos que ficaram isolados da poluição. Gonçalves et al. (2020) observaram um aumento na quantidade de eritroplástídeos em uma espécie de ave endêmica do Cerrado nos fragmentos nas proximidades com o ambiente urbano, o que provavelmente esteve relacionado a uma maior exposição aos poluentes atmosféricos. Em outros animais, como

camundongos *in vivo*, também foi observado um aumento na frequência de micronúcleos quando expostos a poluição do ar em ambiente urbano em comparação aos roedores mantidos no campo distante da cidade (SOARES et al., 2003).

Esses resultados sugerem que as ANE's em animais em ambientes naturais, especialmente nas aves, podem ser um biomarcador útil e valioso para avaliação da qualidade ambiental, baseada em situações de estresse, como no caso da poluição atmosférica.

## CONCLUSÃO

As aves capturadas em fragmentos florestais com qualidade do ar moderada ou ruim apresentaram mais ANE's do que as de em ambientes classificados com boa qualidade do ar. Não houve distinção de respostas entre as espécies analisadas (*Antilophia galeata*, *Basileuterus culicivorus*, *Eucometis penicillata*, *Leptopogon amaurocephalus*, *Myiothlypis flaveola*), o que torna todas as espécies analisadas aptas a serem utilizadas no biomonitoramento ambiental por meio da análise de ANE's. A qualidade do ar é uma variável que explica alterações na quantidade de anomalias nucleares nos eritrócitos.

## REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

ANCIÃES, M.; MARINI, M. Â. The effects of fragmentation on fluctuating asymmetry in passerine birds of Brazilian tropical forests. **Journal of Applied Ecology**, v. 37, n. 6, p. 1013–1028, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00554.x>

BAESSE, C. Q. *et al.* Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, n. 1, p. 223–228, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>

BAESSE, C. Q. *et al.* Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. 1, p. 631–637, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>

---

<sup>3</sup> Referências formatadas de acordo com a NBR 6023 (ABNT, 2018).

BAOS, R. *et al.* Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 2794, 2006. <https://doi.org/10.1897/05-570R.1>

BARKER, J. R.; TINGEY, D. T. The effects of air pollution on biodiversity: a synopsis. *In*: BARKER, J. R.; TINGEY, D. T. (Eds.), **Air Pollution Effects on Biodiversity**. Boston: Springer, 1992. cap. 1, p. 3-9. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3538-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3538-6_1)

CLARK, P.; HUME, A.; RAIDAL, S. R. Erythroplasticity in a Major Mitchell's cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 3, p. 539–542, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1711-y>

CLARK, P.; RAIDAL, S. R. Evaluation of the erythroplastid component of avian blood. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, n. 4, p. 1117–1123, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1750-4>

FARIA, D. B. G. *et al.* Analysis of various effects of abamectin on erythrocyte morphology in Japanese quails (*Coturnix japonica*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2450–2456, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0677-8>

GHAFFAR, A. *et al.* Sodium arsenate and/or urea differently affect clinical attributes, hemato-biochemistry and DNA damage in intoxicated commercial layer birds. **Toxin Reviews**, v. 37, n. 3, p. 206–215, 2018. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1342096>

GÓMEZ-MEDA, B. C. *et al.* Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 206–210, 2006. <https://doi.org/10.1080/03079450600711003>

GONÇALVES, V. F. *et al.* Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in *Antilophia galeata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 1, p. 44650–44655, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10057-y>

GONZÁLEZ-ACEVEDO, A. *et al.* Evaluation of environmental genotoxicity by comet assay in *Columba livia*. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 1, p. 61–66, 2016. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1114059>

MARTÍNEZ- HARO M, M. *et al.* Anthropogenic Influence on Blood Biomarkers of Stress and Genotoxicity of the Burrowing Owl (*Athene Cunicularia*). **Journal of Biodiversity & Endangered Species**, v. 5, n. 3, p. 3–6, 2017. <https://doi.org/10.4172/2332-2543.1000196>

HUSSAIN, R. *et al.* Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, p. 38–42, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.001>

HUSSAIN, R. *et al.* Genotoxic and pathological effects of malathion in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 52, n. 4, p. 1143–1149, 2015.

JONES, M. P. Avian Hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 649–659, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>

KOCH, N. M. *et al.* The application of lichens as ecological surrogates of air pollution in the subtropics: a case study in South Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 20819–20834, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7256-2>

MANHÃES, M. A.; LOURES-RIBEIRO, A. Avifauna da Reserva Biológica Municipal Poço D'Anta, Juiz de Fora, MG. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 3, p. 275–286, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000300023>

MARINI, M. Â.; CAVALCANTI, R. B. Habitat and foraging substrate use of three *Basileuterus* warblers from Central Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 69–76, 1993.

MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *In*: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Eds.) **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**. Oxford: Elsevier, 2003. cap. 1, p. 3–39. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80131-5](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80131-5)

MAS, E. *et al.* Erythrocytic abnormalities in three Antarctic penguin species along the Antarctic Peninsula: biomonitoring of genomic damage. **Polar Biology**, v. 38, n. 7, p. 1067–1074, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1667-2>

MITKOVSKA, V.; CHASSOVNIKAROVA, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 7, p. 7166–7176, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07408-9>

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 281–284, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300005>

PULGARÍN-R, P. C. *et al.* Host species, and not environment, predicts variation in blood parasite prevalence, distribution, and diversity along a humidity gradient in northern South America. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 8, p. 3800–3814, 2018. <https://doi.org/10.1002/ece3.3785>

QUERO, A. A. M. *et al.* Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 25224–25231, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7638-5>

RAWAT, U. S.; AGARWAL, N. K. Biodiversity: Concept, threats and conservation. **Environment Conservation Journal**, v. 16, n. 3, p. 19–28, 2015. <https://orcid.org/0000-0003-0759-9450>

SAMPAIO, D. M. DOS R. *et al.* Ingestion of tannery effluent as a risk factor to the health of birds: A toxicological study using *Coturnix coturnix japonica* as a model system. **Science of The Total Environment**, v. 681, n. 1, p. 275–291, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.046>

SANTOS, C. S. A. *et al.* Assessment of DNA damage in *Ardea cinerea* and *Ciconia ciconia*: A 5-year study in Portuguese birds retrieved for rehabilitation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, n. 1, p. 104–110, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.039>

SCHILDERSMAN, P. A. E. L. *et al.* Possible Relevance of Pigeons. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 3, p. 322–330, 1997. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105322>

SCHMID, W. The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis. *In*: Hollaender, A. (Ed.) **Chemical Mutagens (Principles and Methods for Their Detection)**. Boston: Springer, 1976. cap. 36, p. 31–53. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0892-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0892-8_2)

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTERO-MONTOYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 1, p. 38–45, 2001. <https://doi.org/10.1002/em.1048>

SILVEIRA, E. D. R. *et al.* Micronucleus and different nuclear abnormalities in wild birds in the Cerrado, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16845-4>

SOARES, S. R. C. *et al.* Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. **Environmental Research**, v. 92, n. 3, p. 191–196, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(02\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(02)00061-0)

SOUTO, H. *et al.* Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 1, p. 24084–24092, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2466-4>

SOUZA, J. M. *et al.* A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. **Chemosphere**, v. 175, n. 1, p. 521–533, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.087>

TADANO, Y. DE S.; UGAYA, C. M. L.; FRANCO, A. T. Método de regressão de Poisson: metodologia para avaliação do impacto da poluição atmosférica na saúde populacional. **Ambiente & Sociedade**, v. 12, n. 2, p. 241–255, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1414-753X2009000200003>

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 ed. Pardesh: Pearson. 2013. 756 p.

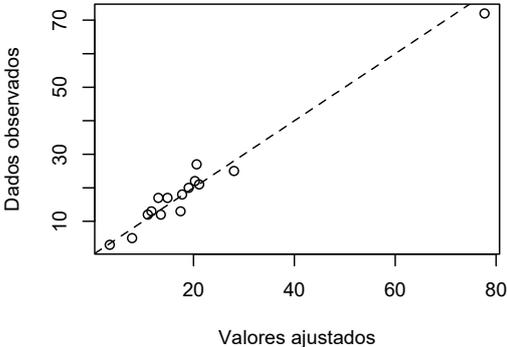
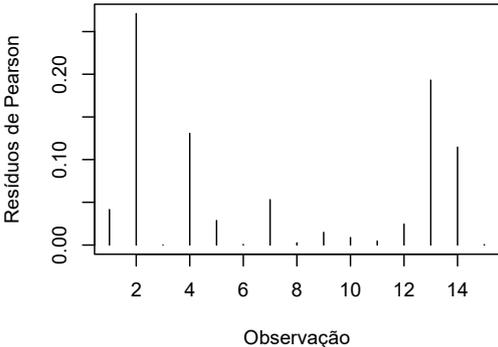
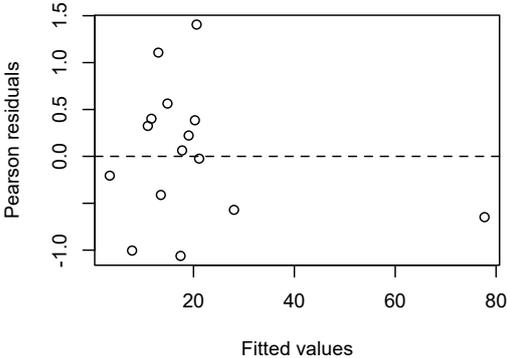
ZUUR, A. F.; HILBE, J. M.; LENO, E. N. **A beginner's guide to GLM and GLMM with R: A frequentist and Bayesian perspective for ecologists**. Newburgh: Highland Statistics Limited, 2013. 270 p.

## APÊNDICES

Apêndice 1: Dados agrupados conforme usados nos modelos lineares generalizados.

Espécies	Número total de ANE's	Qualidade do ar	Número de indivíduos
<i>Antilophia galeata</i>	17	1	57
<i>Antilophia galeata</i>	72	2	147
<i>Antilophia galeata</i>	21	3	25
<i>Basileuterus culicivorus</i>	17	1	50
<i>Basileuterus culicivorus</i>	25	2	53
<i>Basileuterus culicivorus</i>	3	3	4
<i>Eucometis penicillata</i>	5	1	30
<i>Eucometis penicillata</i>	20	2	36
<i>Eucometis penicillata</i>	12	3	16
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	12	1	42
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	13	2	22
<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	22	3	24
<i>Myiothlypis flaveola</i>	13	1	67
<i>Myiothlypis flaveola</i>	27	2	39
<i>Myiothlypis flaveola</i>	18	3	21

Apêndice 2: Gráficos das análises de resíduos.



### **CAPÍTULO 3**

#### **INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA NA FREQUÊNCIA DE ANOMALIAS NUCLEARES ERITROCITÁRIAS EM CANÁRIOS-BELGA *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758)**

## Resumo

A poluição atmosférica, causada pela presença de gases poluentes e material particulado (MP), é considerada um dos principais problemas ambientais podendo ocasionar alterações na morfologia do núcleo celular, as chamadas Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's). O objetivo desse estudo foi comparar a frequência de ANE's de canários-belga mantidos em gaiolas em espaços na área urbana e rural, testando a hipótese de que os indivíduos da área urbana apresentariam maior frequência de anomalias devido a uma maior exposição à poluição do ar. Para isso, foram realizados testes experimentais com canários-belgas (*Serinus canaria*) divididos em dois grupos, expostos por 120 dias a diferentes ambientes: grupo rural (n=20) e grupo urbano (n=20). Os animais foram marcados com anilhas metálicas e, em seguida, foi feita a coleta de sangue para confecção de esfregaços sanguíneos que foram analisados com auxílio de microscópio ótico. A qualidade do ar nos ambientes foi determinada pela medição de material particulado e concentração de monóxido de carbono com o auxílio de um medidor de poluição portátil, sendo o ambiente rural um local de melhor qualidade do ar em relação ao ambiente urbano. Foram avaliados 40 indivíduos de canários-belga em nove dias de coleta, sendo que nos 30 primeiros dias de experimento foi observada a presença de ANE's nos canários-belgas do grupo urbano. No grupo ambiente rural, houve uma variação de 0 a 2 ANE's por amostra, enquanto no grupo ambiente urbano foi de 0 a 28. O modelo Distribuição Binomial Negativa indicou que quantidade de ANE's foi influenciada pelo tipo de ambiente, sendo maior nos animais do ambiente urbano quando comparados com os do ambiente rural ( $p < 0,001$ ). Em relação ao tempo de exposição, no ambiente rural o número de ANE's por amostra aumentou com o tempo de exposição ( $p = 0,00611$ ) e no ambiente urbano houve uma tendência de queda com o tempo de exposição ( $p < 0,001$ ). Portanto, o teste experimental com canários-belgas se mostrou eficaz para avaliar efeitos genotóxicos da poluição do ar em um ambiente urbano.

Palavras-chave: alterações celulares; aves; poluentes.

## **Influence of air pollution and exposure time on the frequency of erythrocyte nuclear abnormalities in the Atlantic canary (*Serinus canaria* - Linnaeus 1758)**

### **Abstract**

Air pollution, which is caused by the presence of pollutant gases and particulate matter (PM), is considered one of the main environmental issues and it can cause alterations in the morphology of the cell nucleus, a phenomenon called erythrocyte nuclear abnormalities (ENAs). This study aimed at comparing the frequency of ENAs in captive Atlantic canaries (*Serinus canaria*) which were kept in urban and rural areas. We hypothesized that individuals in the urban area have a higher frequency of anomalies because they are exposed to higher levels of air pollution. For that, we conducted experimental trials for 120 days with Atlantic canaries divided into two groups (rural and urban) of 20 individuals each. Individuals were first tagged with metal bands and then, we collected blood to prepare blood smears, which were assessed in optical microscope. Air quality (i.e. PM and carbon monoxide concentration) in the areas was quantified using a portable pollution meter. We found that air quality was better in the rural areas than in the urban areas. We analyzed 360 blood samples from 40 individuals of the Atlantic canary, and the urban individuals showed ENAs in the first 30 days of experiment. In the individuals from the rural group, we observed a variation of 0-2 ENAs per sample, while in the urban group this variation was 0-28. The negative binomial distribution model indicated that the quantity of ENAs was related to the type of area where the experiment was conducted. Individuals from the urban areas had higher frequency of ENAs than the rural ones ( $p < 0,001$ ). The number of ENAs increased with the exposure time in the rural individuals ( $p = 0,00611$ ), while in the urban ones the number of ENAs decreased ( $p < 0,001$ ). Therefore, our experimental trial with the Atlantic canaries was efficient to assess the genotoxic effects of air pollution in the urban environment.

Keywords: cell alterations; birds; pollutants.

## INTRODUÇÃO

Os recursos naturais sofrem com a poluição em virtude do desenvolvimento da indústria e da agropecuária e do aumento do número de pessoas no mundo (CORDUK et al., 2018). A poluição atmosférica causada pela presença de gases poluentes, como o monóxido de carbono (CO) e de material particulado (MP) (partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar) é considerada um dos principais problemas ambientais nas últimas décadas sendo que suas concentrações podem ser utilizadas para avaliar a qualidade do ar de uma determinada região (BERINGUI et al., 2021).

A crescente preocupação suscitada pela poluição atmosférica está relacionada aos danos que os poluentes podem causar nos ecossistemas e seres vivos (ALIMBA; BAKARE, 2016; BERINGUI et al., 2021). Em relação aos danos, os efeitos dos poluentes no ambiente podem ocasionar alterações morfológicas e fisiológicas nas populações que permanecem nos ambientes, como mutações; alteração da condição corporal; mudanças externas como a assimetria flutuante; e alterações na morfologia do núcleo celular (BAESSE et al., 2015, 2019; GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES; MELO, 2021; QUERO et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Em relação aos danos citogenéticos, várias técnicas têm sido utilizadas para monitorar os efeitos dos poluentes em uma ampla gama de organismos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, como a análise de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) (GÓMEZ-MEDA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2020; MAS et al., 2015; QUERO et al., 2016; SILVEIRA et al., 2021). A análise de ANE's consiste em detectar alterações na morfologia do núcleo de células sanguíneas de diferentes organismos (CORDUK et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020; KURSA; BEZRUKOV, 2008; MAS et al., 2015; PEREIRA et al., 2014). Alguns estudos em laboratórios e na natureza registraram um aumento na frequência de ANE's gerado por algum tipo de poluente, em vários grupos animais, incluindo as aves (BAESSE et al., 2019;

CORDUK et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020; SAMPAIO et al., 2019; SILVEIRA et al. 2021; SOARES et al., 2003).

As aves são consideradas modelos biológicos para estudar danos causados pela poluição atmosférica (BAESSE et al., 2019; QUERO et al., 2016; SCHILDERMAN et al., 1997), uma vez que estão presentes em praticamente todos os ecossistemas habitados pelos seres humanos (STAHL JR, 1997; BONISOLI-ALQUATI, 2014), pertencem aos mais altos níveis tróficos nos ecossistemas, sendo capazes de acumular vários contaminantes ao longo das cadeias e teias alimentares (STONČIUS; LAZUTKA, 2003; KURSA; BEZRUKOV, 2007; SKARPHEDINSDOTTIR et al., 2010) e acumulam grandes volumes de ar, durante o voo, absorvendo gases e partículas presentes na atmosfera (BAESSE et al., 2019).

Dentre as aves que são utilizadas em estudos experimentais para avaliar efeitos de compostos poluentes, destacam-se os canários. Historicamente, os canários eram expostos a concentrações de metano em minas distribuídas no hemisfério norte para avaliar a qualidade ambiental, sendo considerados sentinelas (KALISIŃSKA, 2019). No nosso estudo, foram utilizados indivíduos de canário-belga (*Serinus canaria* - Linnaeus 1758), um pequeno passeriforme com plumagem verde-amarelada e cinza claro, com asas longas e em diferentes cores, que foi introduzido em várias regiões do mundo a partir do século XV e criado como animal de estimação, inclusive no Brasil (PARSONS, 1987; TAMURA et al., 2021).

O presente estudo teve como objetivo comparar a frequência de ANE's de canários-belga mantidos em cativeiro na área urbana e rural, testando a hipótese de que os indivíduos da área urbana apresentaram maior frequência de anomalias devido à maior exposição à poluição do ar.

## **METODOLOGIA**

### ***Teste experimental<sup>4</sup>***

Para a realização do teste experimental foram utilizados indivíduos adultos de canário-belga, obtidos a partir de um mesmo criadouro regulamentado. Os animais foram anilhados para identificação e divididos em dois grupos, sendo: a) grupo ambiente rural (controle): com 20 indivíduos (10 machos e 10 fêmeas) mantidos em duas gaiolas, com 10 indivíduos em cada (5 macho e 5 fêmeas), em um barracão coberto na zona rural, no município de Araguari - MG; b) grupo ambiente urbano (tratamento): com 20 indivíduos (10 machos e 10 fêmeas) mantidos em duas gaiolas, com 10 indivíduos em cada (5 macho e 5 fêmeas), em uma área residencial em um local de intenso fluxo de veículos no município de Uberlândia - MG. Para prevenir possíveis perdas por mortalidade foram colocados 20% a mais de indivíduos nos dois grupos. Em seguida, os canários foram colocados em uma quarentena de 15 dias para aclimação aos locais de realização do experimento e foi realizada a verificação de ácaros e carrapatos, sendo que nenhum animal apresentou ectoparasitas.

As gaiolas foram protegidas contra animais, sol e chuva, sendo cobertas ao anoitecer e descobertas ao amanhecer. Os canários foram alimentados com alpiste comercial e água mineral *ad libitum* das mesmas marcas (SOARES et al., 2003), por um período contínuo de 120 dias, durante os meses de maio a setembro de 2018. Foram coletadas amostras de sangue dos canários nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias a partir do início da exposição para confecção de esfregaços sanguíneos.

### ***Confecção e análise dos esfregaços sanguíneos***

Para a confecção dos esfregaços sanguíneos, foram realizadas coletas de sangue com agulhas descartáveis (0,8x0,3 mm) inseridas na veia metatársica dos canários. O sangue foi gotejado diretamente em lâminas para serem fixadas em metanol (BAESSE et al., 2015, 2019;

---

<sup>4</sup> Autorizado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - UFU (Protocolo nº 120/15).

SCHMID, 1976; SILVEIRA et al. 2021), coradas com solução de GIEMSA 5% e tampão fosfato (BAESSE et al., 2019; PALHARES; GRISOLIA, 2002), lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente e marcadas com o número da anilha correspondente.

Os esfregaços sanguíneos foram analisados seguindo o modelo *zig-zag* com auxílio de microscópio ótico (Nikon Eclipse E200) com objetiva de 100x (BAESSE et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020). Para análise da quantidade de ANE's foi feita a observação de 5000 eritrócitos por indivíduo em cada coleta.

### ***Qualidade do ar***

A qualidade do ar nos ambientes rural e urbano foi determinada pela medição de material particulado (MP<sub>2,5</sub>) e concentração de monóxido de carbono (CO) com o auxílio de um medidor de poluição portátil (AK898). O medidor ficou exposto nos dois ambientes durante 30 minutos, por um dia no mês de agosto de 2020, sendo que a cada um minuto era registrada a concentração de MP<sub>2,5</sub> e CO.

### ***Análises estatísticas***

Para a classificação dos ambientes foram realizados testes *t* de Student com as médias de MP<sub>2,5</sub> e CO. Para as análises estatísticas foi considerado o número total de ANE'S encontradas nas amostras de sangue, sem distinção entre os tipos, uma vez que foi observada a existência de correlação significativa entre os pares de ANE's: célula binucleada, eritroplástido, núcleo deslocado, núcleo entalhado, constrição assimétrica, constrição simétrica e núcleo multilobulado, conforme análises realizadas em estudo descrito no capítulo 1.

Para testar a hipótese de que o número de ANE's encontradas nas amostras de sangue de um determinado indivíduo é afetado pelo tipo de ambiente e pelo tempo de exposição,

foram ajustados modelos lineares generalizados (GLM), considerando o ambiente (rural ou urbano) como fator fixo, o tempo de exposição como co-variável e a identificação dos indivíduos como fator aleatório. Como a variável resposta é uma contagem, as distribuições de probabilidades consideradas foram: Poisson e Binomial Negativa. A escolha entre elas foi baseada no ajuste aos dados, avaliado por meio do teste de Kolmogorovi-Smirnov (KS); e no ajuste do modelo, usando o desvio residual e o Critério de Informação de Akaike (AIC) (ZUUR, 2013). Além disso, foram feitas análises exploratórias para avaliar a influência do tempo de exposição e sexo na ocorrência de ANE's por meio de testes de Correlação de Spearman. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R versão 4.0.2 (*R Development Core Team, 2020*) e nível de significância de  $p < 0,05$  (ZAR, 2013).

## RESULTADOS

O ambiente urbano apresentou uma concentração de  $MP_{2,5}$  de  $20,97 (\pm 16,31)$   $mcg/m^3$ , enquanto para o ambiente rural foi observado o valor de  $9,42 (\pm 6,36)$   $mcg/m^3$ . Em relação ao CO foi registrada uma média de  $432,06 (\pm 7,81)$  ppm no ambiente urbano e  $382,84 (\pm 3,63)$  ppm no ambiente rural. Foi observado que as taxas de poluentes atmosféricos (CO e  $MP_{2,5}$ ) diferiram estatisticamente (CO:  $t = 31,80$ ,  $df = 60$ ,  $p < 0,0001$ ;  $MP_{2,5}$ :  $t = 3,672$ ,  $df = 60$ ,  $p = 0,0005$ ) sendo ambas menores no ambiente rural (CO:  $382 \pm 3,63$ ;  $MP_{2,5}$ :  $9,41 \pm 6,36$ ) e maiores no ambiente urbano (CO:  $432 \pm 7,81$ ;  $MP_{2,5}$ :  $20,9 \pm 16,3$ ). Sendo assim, nesse contexto, o ambiente rural foi classificado como um local de melhor qualidade do ar em relação ao ambiente urbano, por ter menores níveis de  $MP_{2,5}$  e CO.

Foram avaliados 40 indivíduos de canários-belga em nove dias de coleta, totalizando 360 amostras de sangue analisadas. Nos 30 primeiros dias de experimento foi observado a presença de ANE's nos canários-belgas do grupo urbano (Figura 1), ao contrário dos animais do grupo rural que não registraram nenhuma anomalia nesse mesmo intervalo de tempo

(Tabela 1). No grupo ambiente rural, a média total de ANE's por amostra de sangue (n=180) foi de 0,33 ( $\pm 0,40$ ), com uma amplitude de 0 a 2 anomalias por amostra de sangue de canários-belgas; enquanto no grupo ambiente urbano (n=180), esses valores foram 8,47 ( $\pm 4,96$ ) e 0 a 28, respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1: Valores das médias ( $\bar{x}$ ), desvios padrão (DP) e amplitude (range) do número de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) por amostra de sangue de indivíduos de canário-belga expostos em diferentes períodos experimentais.

Tempo de exposição (dias)	RURAL		URBANO	
	$\bar{x}$ (DP)	Range	$\bar{x}$ (DP)	Range
0	0	0	13,90 (6,87)	0-28
15	0	0	10,30 (5,61)	2-21
30	0	0	9,70 (5,67)	0-26
45	0,60 (0,75)	0-2	8,15 (4,11)	1-15
60	0,70 (0,86)	0-2	6,60 (4,85)	0-15
75	0,65 (0,49)	0-1	6,10 (5,27)	0-22
90	0,60 (0,68)	0-2	8,35 (3,56)	1-16
105	0,30 (0,57)	0-2	9,50 (4,77)	2-19
120	0,15 (0,37)	0-1	3,70 (3,95)	0-12
<b>TOTAL</b>	0,33 (0,40)	0-2	8,47 (4,96)	0-28



FIGURA 1: A) Indivíduo de canário-belga. B) Anomalia Nuclear Eritrocitária (ANE), apontada pela seta, registrada em canários-belgas expostos ao ambiente urbano.

A quantidade de anomalias por amostra de sangue se correlacionou positivamente com o número de dias (tempo de exposição) que os animais ficaram expostos ( $r_s = 0,235$ ;  $p = 0,0015$ ;  $n = 180$ ) para o ambiente rural e negativamente para o ambiente urbano ( $r_s = -0,348$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 180$ ). Portanto, para a construção do modelo predizendo o número de ANE's por amostra de sangue foram considerados o tempo de exposição, o ambiente e a interação entre esses dois fatores. A identificação dos indivíduos como fator aleatório não foi incluída no modelo final devido ao seu efeito reduzido. O sexo também não foi incluído no modelo por não ter tido diferença significativa entre machos e fêmeas ( $p = 0,624$ ).

O modelo linear generalizado (GLM) usando Distribuição de Poisson apresentou superdispersão, com o valor do parâmetro de dispersão igual a 2,3. Sendo assim, foi ajustado um segundo modelo usando Distribuição Binomial Negativa o qual se ajustou melhor aos dados (KS:  $p = 0,612$ ; AIC = 1367) do que a Distribuição de Poisson (KS:  $p = 0,005$ ; AIC = 1572,6). O parâmetro de dispersão do modelo usando Distribuição Binomial Negativa foi aproximadamente 1 e o valor de theta foi 2,789.

De acordo com o GLM Distribuição Binomial Negativa, o tempo de exposição influenciou no número de anomalias de maneira distinta nos dois ambientes. No ambiente rural, o número de ANE's por amostra aumentou com o tempo de exposição ( $\beta_1 > 0$ ,  $p = 0,00611$ ) (Tabela 2), se mantendo zero nos primeiros 30 dias e entre 0 e 2 nos demais (Figura 2). No entanto, no grupo ambiente urbano, apesar do número de anomalias por amostra atingir valores maiores, com variação 0 e 28, houve uma tendência de queda com o tempo de exposição ( $\beta_3 < 0$ ,  $p < 0,001$ ) (Tabela 2; Figura 2). Quando a quantidade de ANE's registradas nos canários-belgas do ambiente urbano foi comparada com as dos animais do grupo rural houve diferença significativa ( $\beta_2 > 0$ ,  $p < 0,001$ ), sendo maiores no ambiente urbano (Figura 3; Tabela 2). O tempo de exposição e o tipo de ambiente explicaram 70% ( $R^2 = 1-357,99/1194,17$ ) da variação no desenvolvimento de ANE's em canários-belgas (Tabela 2).

TABELA 2: Influência do tempo de exposição em dias e do tipo de ambiente (rural ou urbano) na quantidade de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em amostras de sangue de indivíduos de canário-belga mantidos em ambientes rural e urbano.

	Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Valor z	p
Intercepto (quantidade de ANE's no grupo 1)	$\beta_0$	-1,775651	0,302747	- 5,865	$4,49 \times 10^{-9}$
Tempo	$\beta_1$	0,010109	0,003687	2,742	0,00611
Ambiente urbano <sup>1</sup>	$\beta_2$	4,252657	0,316705	13,428	$< 2 \times 10^{-16}$
Tempo: Ambiente urbano <sup>1</sup>	$\beta_3$	-0,016252	0,003923	- 4,143	$3,42 \times 10^{-5}$
Graus de liberdade					
Desvio nulo		1194,17	359		
Desvio residual		357,99	356		

<sup>1</sup> Diferença em relação ao ambiente rural.

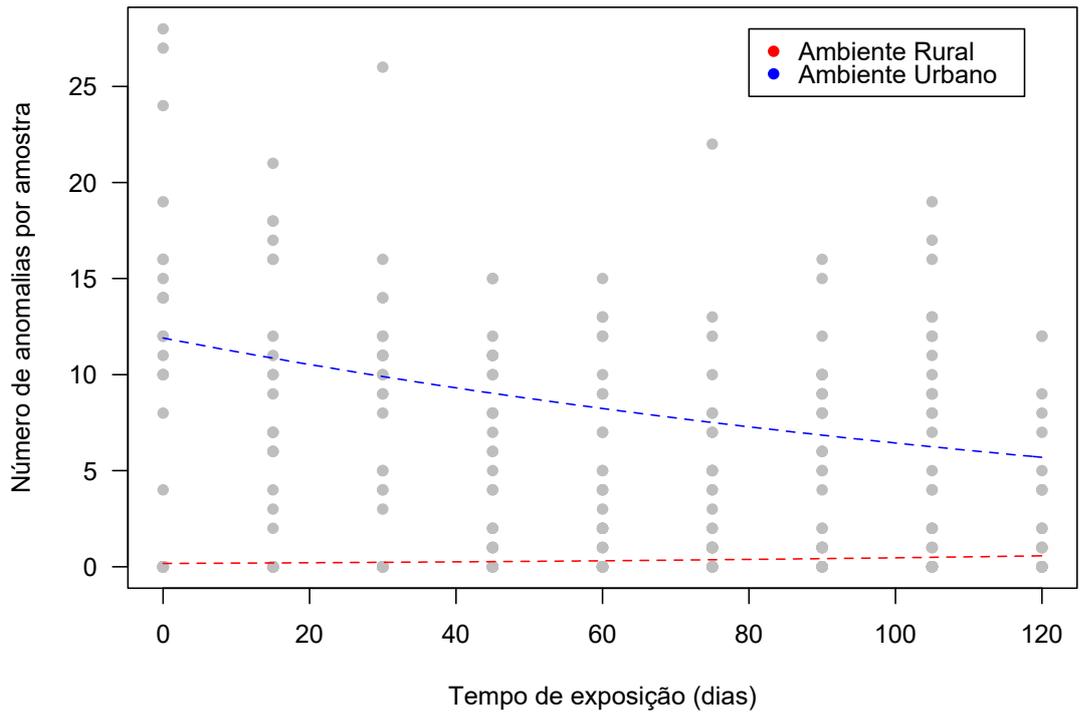


FIGURA 2: Variação no número de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) por amostra de sangue (pontos) de indivíduos de canário-belga, em função do tempo de exposição e curvas ajustadas pelo modelo linear generalizado usando Distribuição Binomial Negativa para os dois ambientes (ambiente rural e ambiente urbano).

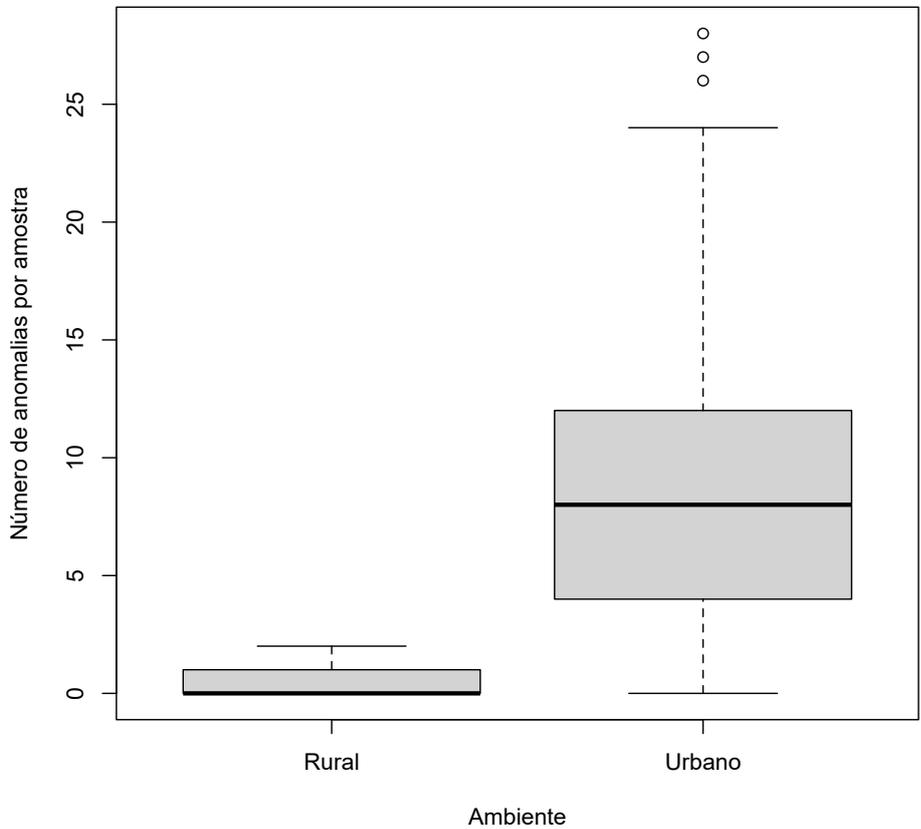


FIGURA 3: Variação no número de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) por amostra de sangue (n = 180) de indivíduos de canário-belga expostos em ambiente rural (n=20) e ambiente urbano (n=20).

## DISCUSSÃO

As aves têm sido utilizadas para avaliar os efeitos genotóxicos nos ambientes devido ao intenso processo de urbanização, sendo consideradas biomonitores (BAESSE et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020). Em nosso estudo, verificamos que canários-belgas, expostos em um ambiente urbano com presença de níveis maiores de monóxido de carbono e material particulado do que em um ambiente rural, já apresentaram ANE's nos primeiros 30 dias do teste experimental, além de uma variação de 0 a 28 anomalias por amostra de sangue. Soares et al., (2003) registraram a presença da alteração do tipo micronúcleo em camundongos expostos na cidade de São Paulo já nos primeiros 15 dias de exposição, com uma variação de 1 a 8 alterações.

A poluição atmosférica, causada pelo material particulado e gases poluentes, como o caso do CO, é considerada um dos principais problemas ambientais (BERINGUI et al., 2021). As partículas contaminantes podem influenciar na quantidade de ANE's registradas nos canários-belgas, uma vez que os animais do grupo ambiente urbano apresentaram maiores médias de anomalias por amostras de sangue em relação aos expostos no ambiente rural. Souto et al. (2018) relatam duas rotas principais de entrada de poluentes nos corpos das aves: uma pelo sistema respiratório e a outra por contaminação das penas (CEYCA CONTRERAS et al. 2020; SANDERFOOT; HOLLOWAY, 2017) No caso do sistema respiratório, ao inalarem o material particulado e gases poluentes, os canários absorvem os contaminantes nos sacos aéreos, o que pode favorecer uma indução de anomalias no núcleo nos eritrócitos devido ao contato (BAESSE et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020; SILVEIRA et al., 2021). Portanto, a análise de anormalidades eritrocitárias se mostra como um dos principais métodos

para detectar danos genômicos relacionados à poluição (BAESSE et al., 2019; BARBOSA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2020; PEREIRA et al., 2014).

Corroborando com nosso estudo, Soares et al. (2003) detectaram diferença significativa entre os grupos de camundongo expostos em um local controle (menores níveis de poluentes) e centro urbano (maiores níveis de poluentes) no estado de São Paulo, Brasil. Tal situação também foi observada por González-Acevedo et al. (2016), em um estudo no México, no qual registraram um aumento significativo de micronúcleos em células sanguíneas de pombos encontrados em parques e praças quando comparados aos animais isolados da poluição. Gonçalves et al. (2020) registraram a presença da anomalia, do tipo eritroplástico (eritrócito sem núcleo), em aves silvestres encontradas em locais próximos ao centro urbano na cidade de Uberlândia, Brasil, com má qualidade do ar. Em um estudo com *Transdecantia pallida* foi registrado um aumento na frequência de micronúcleos, ao longo de 10 anos, em relação ao crescimento da frota de veículos automotivos na cidade de Uberlândia, Brasil e conseqüentemente dos níveis de poluentes no ambiente, uma vez que esses poluentes podem ser absorvidos diretamente pelas plantas durante a fotossíntese (RAI, 2016; BERINGUI et al., 2021)

Em relação ao tempo de exposição, houve um aumento no número de ANE's por amostra de sangue dos canários-belgas do grupo rural, o que não era esperado. No entanto, é importante analisar o tamanho do efeito nesse caso. Ferreira; Patino (2015) ressaltam que é um equívoco interpretar um valor muito pequeno de p como uma significância clínica relevante. A observar o valor de p isoladamente ( $p=0,0061$ ), no caso ANE's/tempo de exposição no ambiente rural, a atenção é desviada do tamanho do efeito, o que leva à conclusão de que a diferença ao longo dos dias de experimento é altamente significativa (FERREIRA; PATINO, 2005). No entanto, ao analisar o impacto clínico, um aumento de 0,6% na quantidade de ANE's, ao longo dos 120 dias de exposição, nos animais do grupo

rural é praticamente insignificante. Outro fator relevante é que as ANE's podem ocorrer de forma espontânea na presença de certos estresses endógenos ou exógenos, sendo que o aumento na frequência, em comparação com níveis de referência, pode ser indicador de efeitos de genotoxicidade (MARTÍNEZ-HARO et al., 2017). Portanto, essa pequena variação temporal nesse grupo pode ser explicada por outros fatores, como a sazonalidade e/ou processos de envelhecimento das células sanguíneas (SATO et al., 1995; DASS et al., 1997; SOARES et al., 2003), sendo um possível indicativo de valores basais de referências para estudos posteriores.

Uma redução na frequência de ANE's ao longo do tempo no grupo urbano pode refletir na capacidade fisiológica da espécie em produzir células alteradas em maior quantidade ou removê-las em situações de estresse (GÓMEZ-MEDA et al., 2006; QUERO et al., 2016). As aves são capazes de renovar os eritrócitos em um período de 25 a 45 dias (JONES, 2015), sendo que esse processo pode ser questionável e alterado devido a outros fatores. Além disso, tal situação pode ser um indicativo de que a poluição atmosférica parece ter uma influência mais significativa no surgimento de anomalias do que o tempo de exposição, ou seja, a presença de poluentes em um curto período já foi suficiente para induzir a formação de ANE's. Em um estudo realizado com morcegos, em Palmas, Brasil, foi encontrada uma alta frequência de micronúcleos em indivíduos capturados em uma ponte com elevado fluxo de veículos, como possível consequência da poluição atmosférica, sem análise temporal (BORGES et al., 2019). Portanto, os resultados do nosso estudo são indicativos de que a poluição atmosférica no ambiente urbano contribuiu para a indução de ANE's em canários-belgas.

## CONCLUSÃO

O teste experimental com canários-belgas se mostrou eficaz para avaliar efeitos genotóxicos da poluição do ar em um ambiente urbano, associado à exposição *in vivo* de longa duração, uma vez que foram isolados outros fatores, como água e alimento. Os animais, expostos em local com maiores níveis de material particulado e monóxido de carbono, apresentaram maiores frequências de ANE's nos primeiros dias de experimento. Sendo assim, as análises de ANE's podem ser usadas como biomarcadores para estimar os danos genotóxicos causados pela poluição atmosférica, além de ser uma técnica de baixo custo e de relativa facilidade.

## REFERÊNCIAS <sup>5</sup>

- ALIMBA, C. G.; BAKARE, A. A. In vivo micronucleus test in the assessment of cytogenotoxicity of landfill leachates in three animal models from various ecological habitats. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 310–319, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1589-3>
- BAESSE, C. Q. *et al.* Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, n. 1, p. 223-228, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>
- BAESSE, C. Q. *et al.* Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. 1, p. 631-637, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>
- BARBOSA, A. *et al.* Pollution and physiological variability in gentoo penguins at two rookeries with different levels of human visitation. **Antarctic Science**, v. 25, n. 2, p. 329–338, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0954102012000739>
- BERINGUI, K. *et al.* Avaliação da concentração e composição inorgânica do material particulado coletado no estado do Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 44, n. 6, p. 737-754, 2021. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170717>
- BONISOLI-ALQUATI, A. Avian genetic ecotoxicology: DNA of the canary in a coalmine. **Current Zoology**, v. 60, n. 2, p. 285-298, 2014. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.2.285>
- BORGES, R. *et al.* Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>

---

<sup>5</sup> Referências formatadas de acordo com a NBR 6023 (ABNT, 2018).

CEYCA-CONTRERAS *et al.* Evaluation of the genotoxic effect of heavy metals in pigeons from urban and rural habitat in Monterrey, Mexico, using the chromatin dispersion assay. **Biomarkers**, v. 25, n. 8, p. 670-676, 2020. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1825811>

CORDUK, N. *et al.* Monitoring of micronuclei and nuclear abnormalities In *Pelophylax ridibundus* erythrocytes from the Biga Stream (Canakkale, Turkey). **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 147-153, 2018.

DASS, S. B. *et al.* Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 381, n. 1, p. 105-110, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00156-5)

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. What does the p value really mean?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 485, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132015000000215>

GÓMEZ-MEDA, B. C. *et al.* Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 206-210, 2006. <https://doi.org/10.1080/03079450600711003>

GONÇALVES, V. F. *et al.* Effects of urban proximity and the occurrence of erythroplastids in *Antilophia galeata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 1, p. 44650–44655, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10057-y>

GONÇALVES, V. F.; MELO, C. Environmental stress and fluctuating asymmetry in *Antilophia galeata*, *Myiothlypis flaveola* and *Basileuterus culicivorus* in Brazilian Savanna. **Oecologia Australis**, v. 25, n. 01, p. 133-141, 2021. <https://doi.org/10.4257/oeco.2021.2501.12>

GONZÁLEZ-ACEVEDO, A. *et al.* Evaluation of environmental genotoxicity by comet assay in *Columba livia*. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 1, p. 61-66, 2016. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1114059>

JONES, M. P. Avian Hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 649-659, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.013>

KALISIŃSKA, E. Endothermic animals as biomonitors of terrestrial environments. *In*: KALISIŃSKA, E. (eds) Mammals and birds as bioindicators of trace element contaminations in terrestrial environments. Springer: Cham, 2019. cap. 2, p. 21-53. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00121-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00121-6_2)

KURSA, M.; BEZRUKOV, V. Health status in an antarctic top predator: Micronuclei frequency and white blood cell differential in the south polar skua (*Catharacta maccormicki*). **Polarforschung**, v. 77, n. 1, p. 1-5, 2008.

MAS, E. *et al.* Erythrocytic abnormalities in three Antarctic penguin species along the Antarctic Peninsula: biomonitoring of genomic damage. **Polar Biology**, v. 38, n. 7, p. 1067-1074, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1667-2>

MARTÍNEZ- HARO M, M. *et al.* Anthropogenic Influence on Blood Biomarkers of Stress and Genotoxicity of the Burrowing Owl (*Athene Cunicularia*). **Journal of Biodiversity &**

**Endangered Species**, v. 5, n. 3, p. 3-6, 2017.  
<https://doi.org/10.4172/2332-2543.1000196>

OLIVEIRA, J. S. P. *et al.* Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. **Science of The Total Environment**, v. 737, n. 1, p. 140304, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140304>

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 281-284, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300005>

PARSONS, J. J. The origin and dispersal of the domesticated canary. **Journal of Cultural Geography**, v. 7, n. 2, p. 19-33, 1987. <https://doi.org/10.1080/08873638709478505>

PEREIRA, B. B. *et al.* Biomonitoring air quality during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil by Tradescantia micronucleus bioassay. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 5, p. 3680-3685, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2335-0>

QUERO, A. A. M. *et al.* Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 25224-25231, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7638-5>

RAI, P. K. Impacts of particulate matter pollution on plants: Implications for environmental biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 120-136, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.012>

SAMPAIO, D. M. R. *et al.* Ingestion of tannery effluent as a risk factor to the health of birds: A toxicological study using *Coturnix coturnix japonica* as a model system. **Science of The Total Environment**, v. 681, n. 1, p. 275-291, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.046>

SANDERFOOT, O. V., HOLLOWAY, T. Air pollution impacts on avian species via inhalation exposure and associated outcomes. **Environmental Research Letters**, v. 12, n. 8, 2017. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8051>

SANTOS, C. S. A. *et al.* Assessment of DNA damage in *Ardea cinerea* and *Ciconia ciconia*: A 5-year study in Portuguese birds retrieved for rehabilitation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, n. 1, p. 104-110, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.039>

SATO, S. *et al.* Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS·MMS. **Mutation Research/DNAging**, v. 338, n. 1-6, p. 51-57, 1995. [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(95\)00011-T](https://doi.org/10.1016/0921-8734(95)00011-T)

SCHILDERSMAN, P. A. E. L. *et al.* Possible Relevance of Pigeons. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 3, p. 322-330, 1997. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105322>

- SCHMID, W. The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis. *In*: Hollaender, A. (Ed.) **Chemical Mutagens (Principles and Methods for Their Detection)**. Boston: Springer, 1976. cap. 36, p. 31–53. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0892-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0892-8_2)
- SILVEIRA, E. D. R. *et al.* Micronucleus and different nuclear abnormalities in wild birds in the Cerrado, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16845-4>
- SKARPHEDINSDOTTIR, H. *et al.* Genotoxicity in herring gulls (*Larus argentatus*) in Sweden and Iceland. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 702, n.1, p. 24-31, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.07.002>
- SOARES, S. R. C. *et al.* Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. **Environmental Research**, v. 92, n. 3, p. 191-196, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(02\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(02)00061-0)
- SOUTO, H. *et al.* Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 1, p. 24084-24092, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2466-4>
- STAHL JR, R. G. Can mammalian and non-mammalian “sentinel species”; data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants? **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 3, n. 3, p. 329-335, 1997. <https://doi.org/10.1080/10807039709383689>
- STONČIUS, D.; LAZUTKA, J. R. Spontaneous and benzo [a] pyrene-induced micronuclei in the embryos of the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1-2, p. 31-39, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00092-5)
- TAMURA, E. K. *et al.* Evaluation of seasonal breeding of the domestic canary (*Serinus canaria*) in an artificial environment. **Ciência Rural**, v. 51, n. 11, e20201064, 2021. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20201064>
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5 ed. Pardesh: Pearson. 2013. 756 p.
- ZUUR, A. F.; HILBE, J. M.; LENO, E. N. **A beginner's guide to GLM and GLMM with R: A frequentist and Bayesian perspective for ecologists**. Newburgh: Highland Statistics Limited, 2013. 270 p.