



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

**OS EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES
AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE PINTOS *Gallus gallus
domesticus* (PHASIANIDAE)**

CARLOS MESA

Orientador (a): Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Urutaí, GO
2019



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado, da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís, da Silva Castro

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

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto, de Menezes

CARLOS MESAK

**OS EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE
RELEVANTES DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE PINTOS *Gallus gallus*
domesticus (PHASIANIDAE)**

Orientador

Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**

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

Urutaí, GO

2019

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

M578e Mesak, Carlos.

Os efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de nanopartículas de ZnO sobre o comportamento de pintinhos Gallus Gallus Domesticus (Phasianidae) / Carlos Mesak. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2019.

24 fls.

Orientador: Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Dissertação (Programa de Pós-graduação de Recursos Naturais do Cerrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2019.

1. Modelo experimental. 2. Nanotoxicologia. 3. Nanomateriais. 4. Predador. 5. Aves. I. Pinto, Guilherme Malafaia. II. Título.

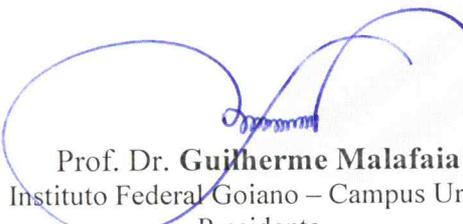
CDU 631/635

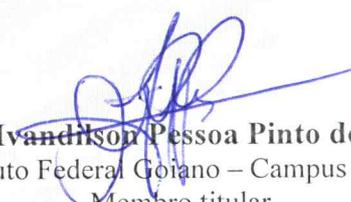


FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	<i>Fitos das nanopartículas de ZnO sobre o comportamento de <u>Gallus gallus domesticus</u> (Aves)</i>
Orientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Autor:	Carlos Mesak

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 18 de fevereiro de 2019, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:


Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Presidente


Prof. Dr. **Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes**
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
Membro titular


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

“O desenvolvimento humano depende fundamentalmente da invenção. Ela é o produto mais importante de seu cérebro criativo. Seu objetivo final é o completo domínio da mente sobre o mundo material e o aproveitamento das forças da natureza em favor das necessidades humanas”.

Nikola Tesla

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as coisas.

A minha família em especial aos meus pais, Adriano Mesak e Elaine Tormim, às minhas irmãs Luana e Adriane, às minhas avós Beralda e Geracina, aos meus tios Sebastião e Lúcia, e aos meus primos Henrique, Daniel e Ludmila.

Aos meus amigos Thales Quintão, Tenilce Gabriela Alvares, Mateus Montalvão, Bruna Mendes, Joice Moreira de Souza, Raphael Campos, Fernando Postalli e Alan Carvalho.

Aos meus professores, Marcus Ramos, Ivandilson Menezes e à Cristiane Maria.

Ao meu orientador Guilherme Malafaia Pinto.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Urutaí pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Nanopartículas	3
2.2. Animais e desenho experimental	3
2.3. Testes comportamentais.....	6
2.3.1. Teste de campo aberto	7
2.3.2. Teste de agregação social.....	7
2.3.3. Resposta ao teste de predador	7
2.4. Biometria e concentração de Zn nos tecidos cerebrais	8
2.5. Análise de dados	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4. CONCLUSÃO	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem microscópica de elétrons de transmissão (TEM) de nanopartículas de ZnO em diferentes amplitudes (A – F).....4
- Figura 2.** Caracterização de nanopartículas de ZnO : (A) Distribuição do diâmetro individual de cada nanopartícula de ZnO; (B) Padrões de difração de raios X da qualidade do cristal das nanopartículas de ZnO e (C) transformada de Fourier - espectros de transmissão no infravermelho.....5
- Figura 3.** Desenhos esquemáticos do aparelho usado no (A) campo aberto, (B) agregação social e (C) resposta aos testes predadores. As cores são meramente ilustrativas.....9
- Figura 4.** (A) Sequência cronológica do teste de agregação social aplicado a pintos (*Gallus gallus domesticus*) expostos, ou não, a nanopartículas de ZnO . (B) Exemplo de protocolo adotado para definir a pontuação do agrupamento de cada grupo de pintos *Gallus gallus domesticus* expostos, ou não, a nanopartículas de ZnO.....10
- Figura 5.** (A) Número total de cruzamentos e (B) índice de ansiedade de pintos expostos, ou não, a diferentes concentrações de nanopartículas de ZnO no teste de campo aberto.....13
- Figura 6.** (A) Escores de clusters registrados nos testes de agregação social e (B) frequência dos movimentos da cabeça, e (C) tempo gasto na zona de segurança registrada para pintos expostos, ou não, às nanopartículas de ZnO.....16
- Figura 7.** Concentração de Zn (mg g⁻¹) no tecido cerebral de pintos expostos, ou não, a nanopartículas de ZnO.....17

OS EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO SOBRE O COMPORTAMENTO DE PINTOS *Gallus gallus domesticus* (PHASIANIDAE)

RESUMO

A toxicidade das nanopartículas de ZnO (NPs) tem sido objeto de várias investigações, no entanto, concentrações muito superiores às potencialmente encontradas no ambiente são frequentemente testadas. Além disso, grupos de animais como aves não têm sido utilizados como modelo em estudos neste campo, fato que cria uma lacuna ecotoxicológica importante neles. O objetivo do presente estudo é investigar os efeitos da exposição a concentrações ambientalmente relevantes de nanopartículas de ZnO sobre o comportamento anti-predatório de pintinhos (*Gallus gallus domesticus*). Os animais de teste foram diariamente expostos a uma concentração ambientalmente relevante de nanopartículas de ZnO ($0,245 \text{ mg kg}^{-1}$) e a uma concentração tóxica da mesma ($245,26 \text{ mg kg}^{-1}$) a via de entrega escolhida foi a injeção intraperitoneal durante dois dias. Nós definimos um grupo de controle para fins de comparação. De acordo com nossos resultados, as nanopartículas de ZnO não afetaram a atividade locomotora e não causaram efeito ansiolítico ou ansiogênico nas aves no teste de campo aberto. No entanto, com base no menor escore de cluster registrado durante o teste de agregação social, pintos expostos a nanopartículas de ZnO não conseguiram reconhecer o grunhido de um falcão (*Rupornis magnirostris*) como ameaça predatória. Apenas as aves do grupo controle reconheceram a cobra-teste (*Pantherophis guttatus*) como predadora em potencial. A maior concentração de Zn no cérebro de animais expostos a nanopartículas de ZnO evidenciou a capacidade desses nanomateriais de atravessar barreira hematoencefálica, mesmo em baixas concentrações. Esse cruzamento da barreira hematoencefálica poderia ter afetado as estruturas ou mecanismos neuronais que modulam a resposta defensiva das aves. Supostamente, mesmo a exposição mínima a baixas concentrações de nanopartículas de ZnO pode afetar as aves. Nossos resultados corroboram estudos prévios sobre os riscos biológicos da contaminação da superfície da água por nanomateriais à base de metais.

Palavras-chave: Modelo experimental, Nanotoxicologia, Nanomateriais, Predador, Aves.

THE EFFECTS OF PREDICTED ENVIRONMENTALLY RELEVANT CONCENTRATIONS OF ZnO NANOPARTICLES ON THE BEHAVIOR OF *Gallus gallus domesticus* (PHASIANIDAE) CHICKS

ABSTRACT

The toxicity of ZnO nanoparticles (NPs) has been the subject of several investigations; however, concentrations much higher than the ones potentially found in the environment are often tested. In addition, groups of animals such as birds have not been used as model in studies in this field, fact that creates an important ecotoxicological gap in them. The aim of the present study is to investigate the effects of the exposure to environmentally relevant concentrations of ZnO nanoparticles on the anti-predatory behavior of chicks (*Gallus gallus domesticus*). The test animals were daily exposed to an environmentally relevant concentration of ZnO nanoparticles (0.245 mg kg⁻¹) and to a toxic concentration of it (245.26 mg kg⁻¹) through intraperitoneal injection for two days. We set a control group for comparison purposes. According to our results, ZnO nanoparticles did not affect the locomotor activity of, and did not cause anxiolytic or anxiogenic effect on, birds in the open field test. However, based on the lowest cluster score recorded during the social aggregation test, chicks exposed to ZnO nanoparticles failed to recognize the grunt of a hawk (*Bubo magurostris*) as predatory threat. Only birds in the control group recognized the test snake (*Pantherophis guttatus*) as potential predator. The higher Zn concentration in the brains of animals exposed to ZnO nanoparticles evidenced the capacity of these nanomaterials to cross the blood-brain barrier, even at low concentrations. This blood-brain barrier crossing could have affected the structures or neuronal mechanisms that modulate the defensive response of birds. Assumingly, even the minimal exposure to low concentrations of ZnO nanoparticles can affect birds. Our outcomes corroborate previous studies about the biological risks of water surface contamination by metal-based nanomaterials.

Keywords: Experimental model, Nanotoxicology, Nanomaterials, Predator, Birds.

1. INTRODUÇÃO

O óxido de zinco (ZnO) é uma das nanopartículas (NPs) mais utilizadas e estudadas no mundo (Baun et al., 2008 ; Espitia et al., 2012 ; McCall, 2011). Este componente é encontrado em produtos comerciais, como cremes dentais, cosméticos, protetores solares, material têxtil, tintas de parede e materiais de construção (Xia et al., 2008 ; Zvyagin et al., 2008 ; Smijs & Pavel, 2011 ; Vanderiel & Jong, 2012) . Vários estudos já investigaram o potencial toxicológico desta NP em diferentes níveis de organização biológica (Pati et al., 2016 ; Sheida et al., 2017 ; Almansour et al., 2017 ; Wang et al., 2017 ; Hou et al., 2018). Com base em vários estudos de modelagem multimídia e de múltiplos compartimentos em águas superficiais, e apesar do conhecido nexos de causalidade entre a exposição a nanopartículas de ZnO e os danos causados por elas (citotoxicidade, genotoxicidade , neurotoxicidade , toxicidade reprodutiva e imunotoxicidade), é conhecido sobre seus efeitos nas concentrações ambientais previstas (Boxall et al., 2007; Gottschalk et al., 2009; Sun et al., 2014; Dumont et al., 2015). Esses estudos forneceram informações aos ecotoxicólogos sobre possíveis faixas de concentração de nanopartículas de ZnO que podem ser usadas para projetar testes de toxicidade aguda e crônica e avaliar os dados de toxicidade.

A avaliação para medir a toxicidade das nanopartículas de ZnO é frequentemente baseada em valores quantitativos de toxicidade (CE50, CL50, CIM) [ver revisão de Bondarenko et al. (2013)], que podem não corresponder às concentrações encontradas em ambientes naturais. Muitos estudos neste campo têm usado modelos experimentais não vertebrados , como bactérias, crustáceos , algas , nematóides , leveduras e protozoários como sujeitos (Bondarenko et al., 2013). Portanto, existe uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos da exposição de vertebrados a concentrações preditivas e ambientalmente relevantes de nanopartículas de ZnO. Existe apenas um estudo sobre a toxicidade das nanopartículas de ZnO em um modelo de vertebrados baseado em condições ambientais realistas: baixas concentrações de ZnO potencialmente encontradas em águas superficiais. Segundo Souza et al. (2018a) , camundongos expostos a nanopartículas de ZnO na dose de $5,625 \times 10^{-5} \text{ mg kg}^{-1}$, por cinco dias, apresentaram alterações comportamentais. Essa dose correspondeu à quantidade de nanopartículas de ZnO que os animais podem ingerir diariamente (Souza et al., 2018a).

Nosso objetivo é entender se efeitos similares seriam observados em outros grupos de vertebrados submetidos a contato crônico ou eventual com nanopartículas de ZnO. Grupos de aves permanecem inexplorados pelo campo da nanotoxicologia devido a vários fatores, incluindo sua distribuição mundial, habilidades migratórias, diferentes hábitos de forrageamento, natureza conspícua e sensibilidade a poluentes ambientais. No entanto, a exposição de grupos de aves a contaminantes

tem sido melhor documentada do que a exposição de outros grupos de vertebrados terrestres (Jaspers, 2015), mas a maioria dos estudos envolvendo aves concentra-se em testes toxicológicos tradicionais e presta pouca atenção a efeitos não letais em curto prazo. Não há nenhum relatório sobre a toxicidade desses nanomateriais em animais expostos a eles, seja em doses / concentrações baseadas em testes de toxicidade aguda (CE50, CL50, MIC) ou em concentrações ambientais previstas. Consequentemente, a importância de avaliar os riscos potenciais associados à exposição de aves às nanopartículas de ZnO é inegável, uma vez que estes animais podem entrar em contato com tais NPs em condições reais diferentes.

Avaliar o efeito de poluentes, incluindo nanopartículas de ZnO, sobre o comportamento típico das aves é essencial, uma vez que pequenas alterações biológicas podem prejudicar a aptidão desses indivíduos e a dinâmica da população. O comportamento natural desses animais é caracterizado por sua resposta anti-predatória defensiva, cuja principal função é reduzir as ameaças enfrentadas por eles ou sua vulnerabilidade (Yang et al., 2004). A predação é a causa mais importante de falha reprodutiva na maioria das espécies de aves (Ricklefs, 1969 ; Montgomerie & Weatherhead, 1988 ; Maziarz et al., 2018), embora as aves adotem vários comportamentos anti- predadores (Caro, 2005) para ampliar suas chances de alcançar uma reprodução bem-sucedida. O comportamento anti-predatório, além de ser uma resposta animal inata, é particularmente importante porque os distúrbios nos mecanismos usados para reconhecer potenciais predadores podem levar ao aumento dos riscos de predação (Yang et al., 2004). Alterações anti-predatórias de comportamento defensivo e biomarcadores sensíveis são importantes para avaliar os efeitos xenobióticos na biologia de muitas espécies (Mendes et al., 2017 ; Souza et al., 2018b ; Cardoso et al., 2018).

Nosso objetivo foi investigar se a exposição curta a nanopartículas de ZnO, mesmo em concentrações ambientais previstas, poderia causar mudanças comportamentais em pintos *Gallus gallus domesticus* (Phasianidae), bem como inferir os riscos ecológicos de tais NPs. Também procuramos correlacionar a exposição das aves a possíveis mudanças na massa corporal total e nas massas relativas de cérebro e fígado das aves, que são comumente usadas como biomarcadores de toxicidade sistêmica. Nosso estudo surge como um passo incremental para uma série de estudos sobre a toxicidade das nanopartículas de ZnO e abre novas janelas para futuras investigações relacionadas à nanotoxicologia das aves.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Nanopartículas

No presente estudo foram utilizados nanocristais sem qualquer modificação de superfície (NPs não revestidos), nanopartículas de ZnO (pureza > 99,99% - Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA; CAS número 544906) utilizadas no presente estudo. Sua caracterização química foi previamente realizada por nosso grupo de pesquisa (Souza et al., 2018a). A solução estoque de nanopartículas de ZnO (18 mg L^{-1}) foi preparada em água destilada e dispersa por 10 minutos em sonicador para evitar a agregação. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e difração de raios X (XDR) após sonicação de 30 minutos foram os instrumentos de escolha para apresentar a solução de ZnO. Nós usamos o espectrômetro Alpha-T (Perkin Elmer Lambda 1050) para gravar os espectros de transformação de Fourier-infravermelho (FTIR) das amostras. Com base na análise do TEM, as partículas cristalinas e poligonais (Fig. 1 A-F) tinham diâmetro individual de $68,96 \pm 33,71 \text{ nm}$ (Fig. 2 A). Fig. 2 B mostra os padrões de XRD das nanopartículas de ZnO. Picos em $2\theta = 31,67^\circ, 34,31^\circ, 36,14^\circ, 47,40^\circ, 56,52^\circ, 62,73^\circ, 66,28^\circ, 67,91^\circ, 69,03^\circ$ e $72,48^\circ$ foram atribuídos a (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201) e (004) nanopartículas de ZnO, respectivamente. Não identificamos picos de impurezas e sugerimos a alta qualidade das nanopartículas de ZnO. A Fig. 2 C mostra os espectros de FTIR das amostras.

2.2. Animais e desenho experimental

A espécie *Gallus gallus domesticus* é utilizada como modelo experimental para testar a toxicologia ambiental em todo o mundo (Carvalho et al., 2008; Gul et al., 2017). Foram utilizados 45 pintos híbridos comerciais autosexados, machos, pertencentes à variedade “Embrapa-021”, que deriva do cruzamento White Cornish x White Plymouth Rock, em nosso estudo. Os pintinhos foram fornecidos por uma incubadora comercial no sétimo dia de vida. Nós dividimos os modelos em grupos com 15 animais. Cada grupo foi colocado em gaiolas (70 cm de comprimento x 50 cm de largura x 25 cm de altura) armazenadas em sala de ensaio a temperatura controlada ($24^\circ \pm 2^\circ \text{ C}$) sob lâmpadas de infravermelho de 250 W e submetidas a luz artificial de 12 h / ciclos escuros. Alimentos e água foram fornecidos *ad libitum*. Tampas de malha de arame impediram os pássaros de saltar da gaiola. O presente estudo foi aprovado pelo Institutional Care and Use Committee da universidade em que a pesquisa foi conduzida. Seguimos os padrões de atendimento e teste de conformidade para aves de acordo com os regulamentos locais, estaduais e nacionais. Os animais foram submetidos ao menor sofrimento, estresse externo, dor e desconforto possível. Não excedemos o número de animais necessários para produzir dados científicos confiáveis.

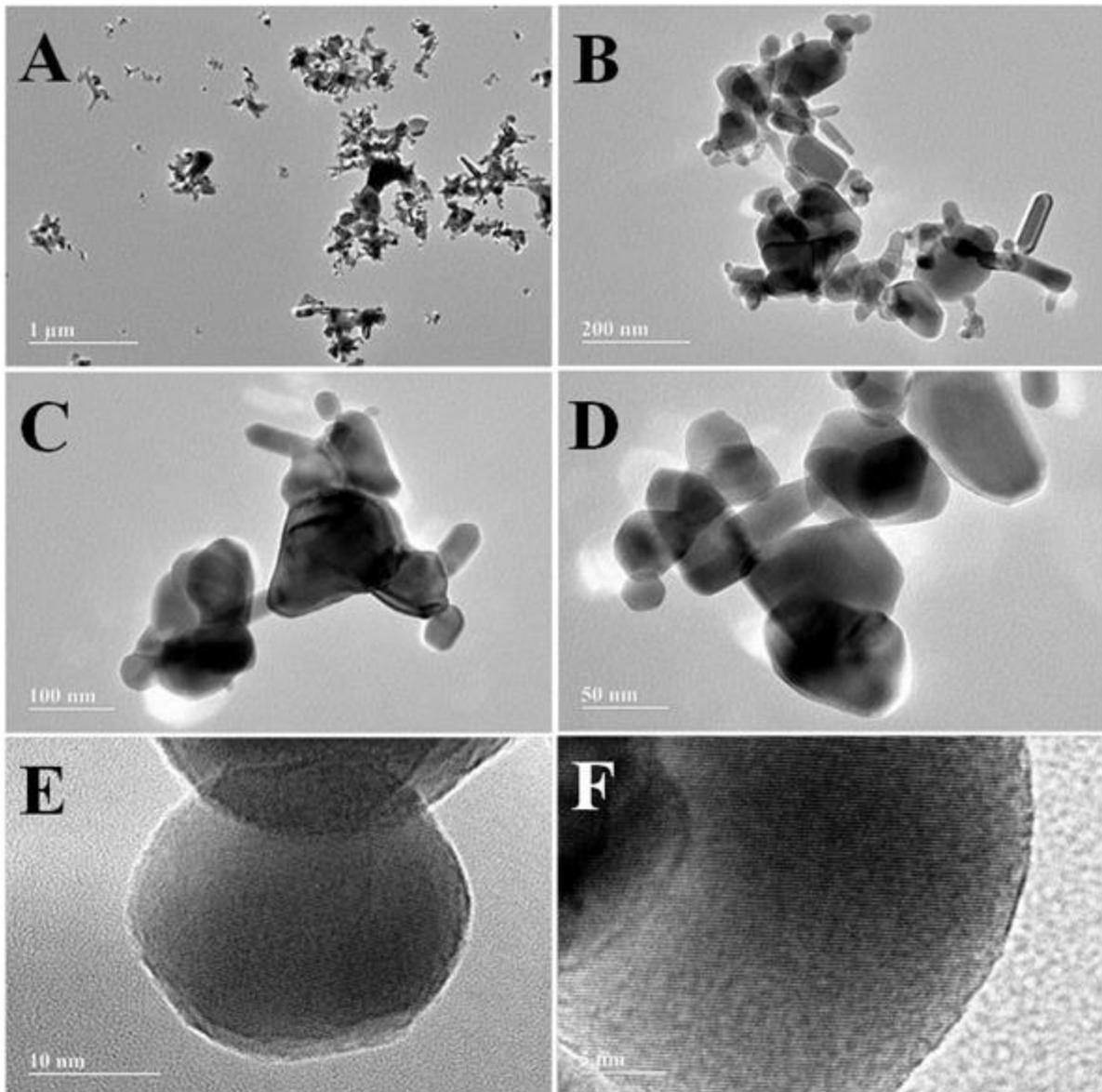


Figura 1. Imagem microscópica de elétrons de transmissão (TEM) de nanopartículas de ZnO em diferentes amplitudes (A – F).

Os pintinhos se acostumaram às condições de laboratório por 48 h antes do experimento. Distribuimos as aves com biomassa corporal contrabalançada nos seguintes grupos experimentais: (i) controle (não exposto a nanopartículas de ZnO - $n = 15$); (ii) expostos a nanopartículas de ZnO em concentrações preditivas ambientalmente relevantes ($EC1x = 245,26 \mu \text{ kg}^{-1} = 0,245 \text{ mg kg}^{-1}$ - $n = 15$); e (iii) expostos a altas concentrações de nanopartículas de ZnO ($EC1000x = 245.260,00 \mu \text{ kg}^{-1} = 245,26 \text{ mg kg}^{-1}$ - $n = 15$). Administramos uma solução de nanopartículas de ZnO diluídas em água destilada nos modelos de teste através de injeção intraperitoneal por dois dias. Cada animal foi pesado diariamente para ajustar com precisão a dose da droga.

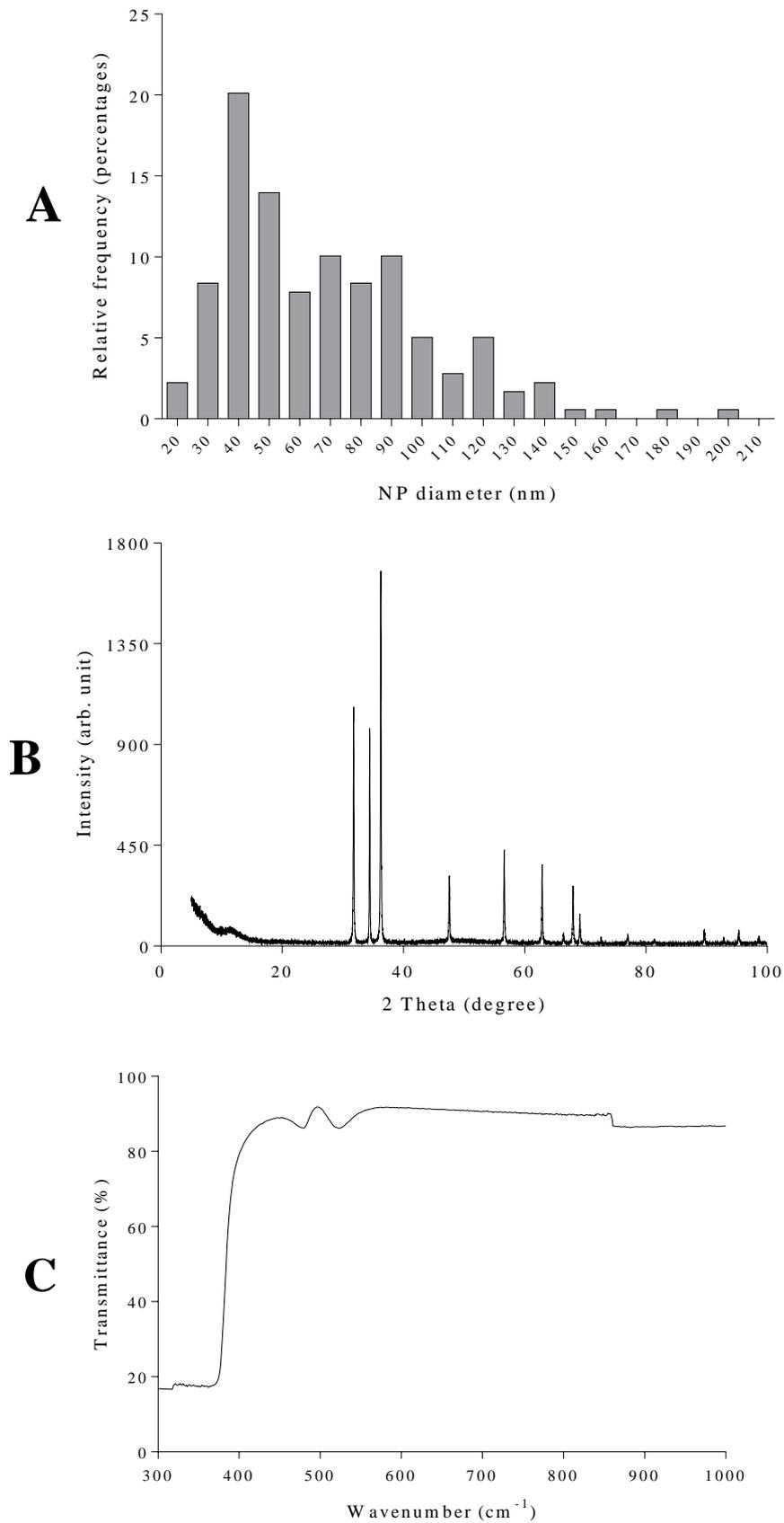


Figura 2. Caracterização de nanopartículas de ZnO : (A) Distribuição do diâmetro individual de cada nanopartícula de ZnO; (B) Padrões de difração de raios X da qualidade do cristal das nanopartículas de ZnO e (C) transformada de Fourier - espectros de transmissão no infravermelho.

Adotamos o período de exposição de 2 dias porque as aves selvagens apenas bebem água de fontes contaminadas ocasionalmente. Outras fontes de água usadas por esses animais podem não estar necessariamente contaminadas, portanto, nosso projeto experimental procurou aproximar as condições simuladas ao cenário mais realista possível. Nós administramos por via intraperitoneal a solução de teste para garantir a entrega de doses iguais. As aves podem beber quantidades diferentes de água; portanto, fornecer água com o agente tóxico não resultaria em dosagem igual.

Baseado em Boxall et al. (2007) , a concentração ambientalmente relevante prevista de nanopartículas de ZnO para calcular sua taxa de aplicação para aves seria de $760.000 \text{ ng L}^{-1}$. Esses autores usaram algoritmos para estimar os potenciais intervalos de concentração de NPs na água. Eles se concentraram em cosméticos, produtos para cuidados pessoais e tintas. Seus dados foram baseados em faixas de concentração de NP encontradas nesses produtos. Eles modelaram três cenários hipotéticos baseados em dados sobre a fração de NPs encontrados em produtos disponíveis no mercado. Escolhemos o cenário em que 10% de um produto compreendiam nanopartículas modificadas. Segundo os autores supracitados, 10% dos produtos do setor doméstico possuem esses NPs. Assim, modelamos a concentração $760.000 \text{ ng L}^{-1}$ baseado em um cenário “conservacionista”, sem transformar / depositar ou remover nanopartículas de ZnO dos rios. Também levamos em conta a exposição ambiental potencial a múltiplas fontes, porque as nanopartículas modificadas podem ser usadas em muitos tipos de produtos, por exemplo, os fulerenos C60 podem ser encontrados na formulação de uma ampla gama de cosméticos.

Nós expusemos os pintinhos à quantidade de nanopartículas de ZnO a que estão expostos diariamente devido à ingestão de água contaminada com esses NPs na concentração de $760.000 \text{ ng L}^{-1}$. Biomassa animal $57,06 \pm 5,64 \text{ g}$ e volume médio diário de ingestão de água de $18,4 \text{ mL} \pm 0,5$ / dia (volume medido em estudos anteriores realizados em nosso laboratório) foram nossos parâmetros de escolha para definir as doses de exposição. Cada pintinho recebeu $0,245 \text{ mg kg}^{-1}$ de nanopartículas de ZnO diariamente. Supostamente, a alta concentração de nanopartículas de ZnO ($245,26 \text{ mg kg}^{-1}$) seria tóxica para os modelos; portanto, os grupos submetidos a ele foram os controles positivos.

2.3. Testes comportamentais

Com base em nossa hipótese, a exposição às nanopartículas de ZnO pode afetar as regiões do sistema nervoso central responsáveis pelas respostas de defesa dos modelos avaliados. Submetemos os filhotes a diferentes testes comportamentais um dia após a última administração de nanopartículas de ZnO para testar se os tratamentos poderiam mudar seu sistema locomotor antes de testar sua resposta a potenciais predadores. Os testes adotados foram: campo aberto seqüencial, agregação social e resposta ao predador.

2.3.1. Teste de campo aberto

Adaptamos o teste de campo aberto a aves, baseado nos procedimentos metodológicos de Formanek et al. (2008) . Uma caixa branca opaca (58 cm de largura x 38 cm de altura x 40 cm de comprimento) foi utilizada (Figura .3 A) no experimento. O fundo de cada caixa tinha vinte quadrantes desenhados (Figura. 3 A). Cada ave de teste foi colocada no centro do aparato com o bico virado para o lado direito do mesmo. Uma lâmina de vidro transparente foi colocada no lado superior da caixa para evitar que os animais escapassem (Figura. 3A) - cada animal foi gravado em vídeo por 5 min. Nós higienizamos o aparelho com álcool a 70% entre as sessões de teste. Calculamos a locomoção na razão quadrantes centrais / locomoção total e utilizamos a frequência de cruzamentos através dos quadrantes centrais e periféricos para medir a atividade locomotora durante o teste de campo aberto. Esses parâmetros foram avaliados no software PlusMZ.

2.3.2. Teste de agregação social

O teste de agregação social foi adaptado do estudo de Collins et al. (2011) e Parker et al. (2017) . Instalamos um alto-falante acoplado a um computador na sala de teste para avaliar a agregação de pintos em resposta a estímulos predatórios. O orador reproduziu o grunhido de uma ave de rapina . Utilizamos uma caixa de madeira retangular (dimensões: 120 cm de comprimento x 30 cm de largura x 30 cm de altura) com 15 quadrantes desenhados em sua parte inferior no experimento (Figura. 3 B). As aves foram colocadas individualmente dentro do aparelho.

Cada ave de teste aclimatou-se ao aparelho por 60 segundos. Reproduzimos a vocalização de um sapo (*Rhinella marina* - não predador) e de um falcão (*Rupornis magnirostris* - potencial predatório) dentro do aparelho a 70 dB - os períodos de silêncio entre as vocalizações foram programados (figura. 4 A). A espécie de gavião escolhida é um predador natural de pequenas aves (Santos & Rosado, 2009).

A análise de agregação social foi baseada nos escores do cluster (intervalos de 5 segundos) registrados durante as sessões com (5 minutos), e sem (5 minutos), a vocalização do potencial predador, segundo metodologia adaptada de Collins et al. (2011) . Calculamos os escores do cluster de cada intervalo de tempo analisado (5 segundos) dividindo o número máximo de pintinhos em um quadrante pelo número de quadrantes ocupados pelo número total de animais (Figura. 4 B).

2.3.3. Resposta ao teste de predador

O objetivo da resposta ao teste de predador foi verificar o comportamento dos animais em resposta à presença de um predador em potencial (uma cobra, *Corn Snake - Pantherophis guttatus*,

padrões de cor: *Okeetee* - normal ou comum -, masculino, 4 anos de idade). Adotamos procedimentos semelhantes aos utilizados por Mendes et al. (2017), Cardoso et al. (2018) e Souza et al. (2018b). O design do aparato evitou o contato físico entre predadores e pintinhos, mas permitiu que os estímulos visuais, olfativos e auditivos atingissem os modelos. O aparelho utilizado em nosso estudo (70 cm de comprimento x 14,5 cm de largura x 30 cm de altura) foi dividido em diferentes zonas: 1, 2 e 3 (figura. 3C). Zona 1 (a zona segura) foi a mais distante do predador. Zona 2 (zona neutra) foi a parte intermediária do aparelho. A zona 3 (zona aversiva) foi a mais próxima do predador. Cobrimos as paredes laterais do aparelho com cortinas para evitar a influência de qualquer estímulo externo sobre o comportamento dos modelos testados.

Nós conduzimos a resposta ao teste de predador em três sessões diferentes. Na primeira sessão, os modelos foram colocados na “zona neutra”, mas a “zona predatória” não forneceu nenhum estímulo predatório (Figura. 3 C.1). As aves poderiam explorar o dispositivo por 5 min para aclimação. As aves foram levadas para as caixas de residência após o tempo de aclimação.

Na segunda sessão, colocamos uma cobra falsa na “zona do predador” (silicone, não tóxico e inodoro - OTHODOOX comprado em www.amazon.com) do aparelho antes do teste (Figura. 3 C.2). Nós levamos os pássaros de teste de volta para a “zona neutra” para que eles pudessem interagir com a cobra falsa por mais de 5 minutos.

Na terceira sessão, colocamos uma cobra real no aparato e os modelos puderam girar em torno do aparelho por mais 5 minutos (Figura. 3 C.3). Nós higienizamos o aparelho com álcool a 70% entre as sessões. Os seguintes parâmetros foram analisados em cada sessão de teste: Tempo (segundos) gasto (segundos) pelo modelo na “zona de segurança”, número total de cruzamentos e frequência dos movimentos da cabeça. Os parâmetros medidos na ausência de estímulos predatórios, na presença de uma cobra falsa e na presença de *P. guttatus* foram calculados no software PlusMZ.

2.4. Biometria e concentração de Zn nos tecidos cerebrais

A massa corporal total e a massa relativa do cérebro e do fígado das aves testadas foram os parâmetros de escolha para indicar a toxicidade sistêmica. Nós normalizamos a massa do cérebro e do fígado para o peso corporal através da seguinte fórmula: massa cerebral (ou fígado) (gramas) / peso corporal (gramas).

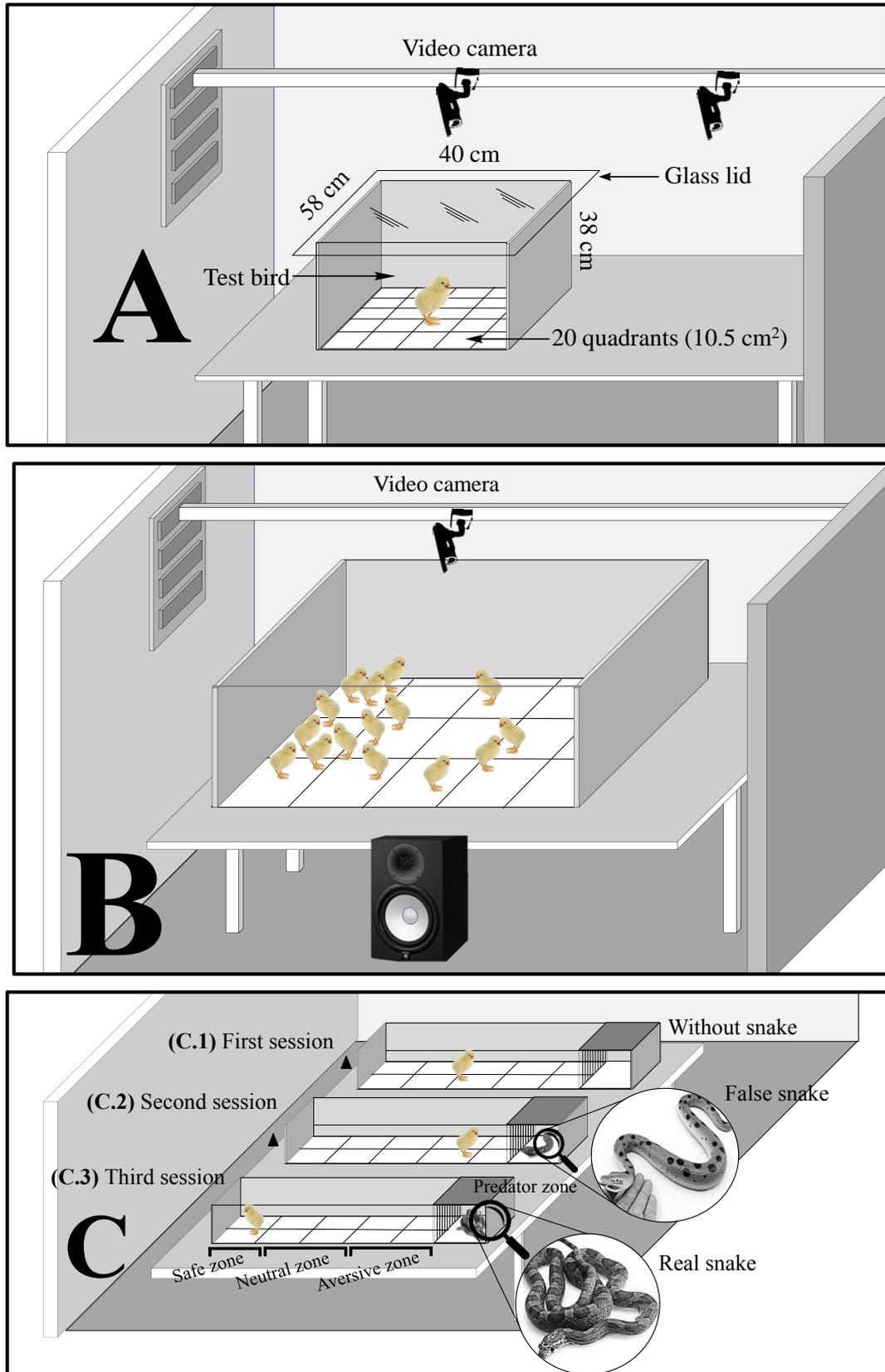


Figura 3. Desenhos esquemáticos do aparelho usado no (A) campo aberto, (B) agregação social e (C) resposta aos testes predadores. As cores são meramente ilustrativas. (Para interpretação das referências a cor nesta legenda da figura, o leitor é encaminhado para a versão da Web deste artigo.)

Quantificamos a quantidade de Zn em amostras de tecido cerebral coletadas das aves de teste para avaliar qualquer possível ligação entre a concentração de Zn e as mudanças de comportamento. A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Element, Finnigan MAT, Alemanha) foi o nosso instrumento de escolha para quantificar a concentração de Zn, com base no método descrito por Souza et al. (2018a). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicado e a concentração de Zn nas amostras de tecido cerebral foi expressa em $\mu\text{g} / \text{g}$ de tecido de peso seco.

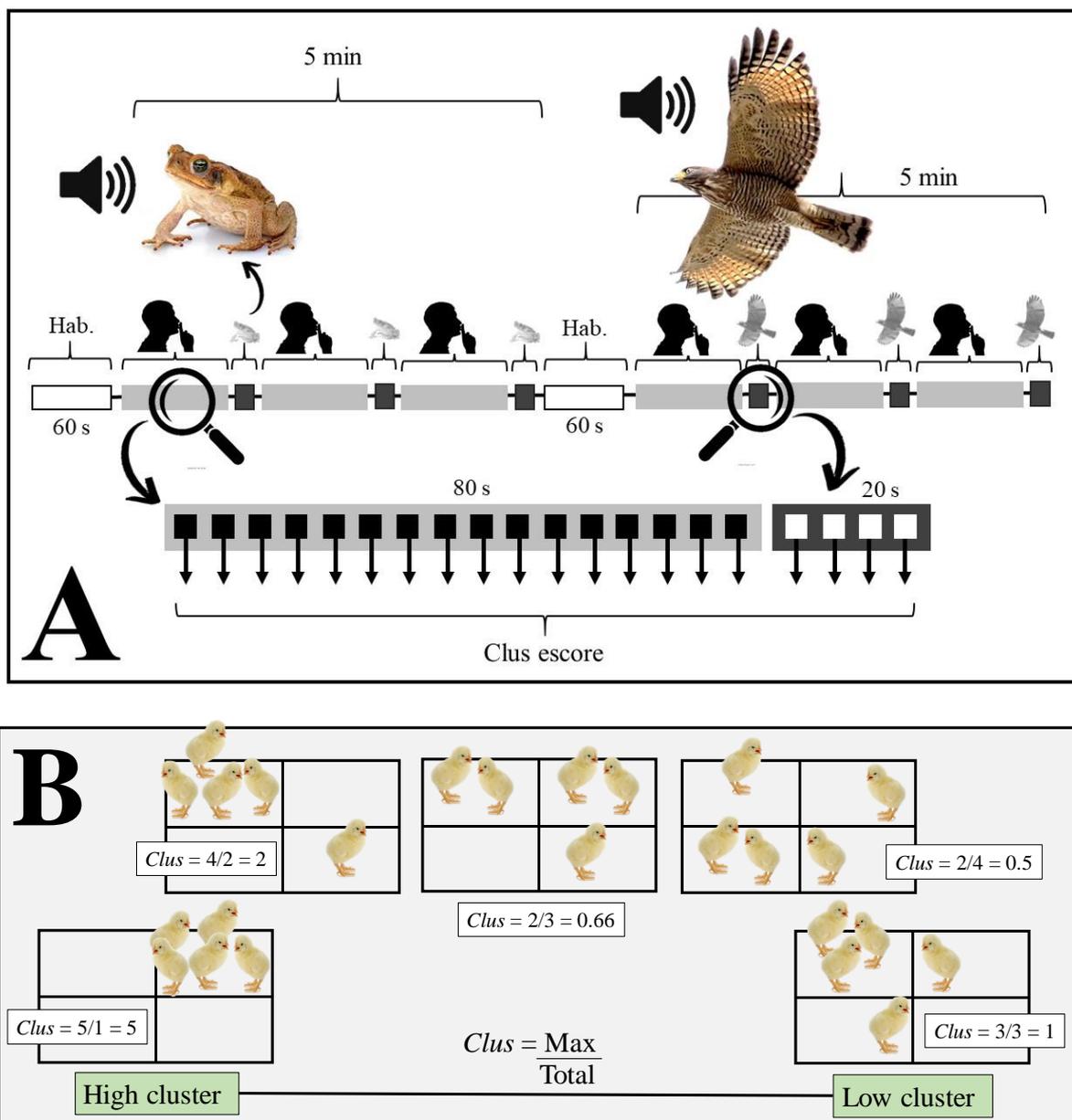


Figura 4. (A) Sequência cronológica do teste de agregação social aplicado a pintos (*Gallus gallus domesticus*) expostos, ou não, a nanopartículas de ZnO. (B) Exemplo de protocolo adotado para definir a pontuação do agrupamento de cada grupo de pintos *Gallus gallus domesticus* expostos, ou não, a nanopartículas de ZnO. As cores são meramente ilustrativas. Clus: cluster. (Para interpretação das referências a cor nesta legenda da figura, o leitor é encaminhado para a versão da Web deste artigo.)

2.5. Análise de dados

Submetemos os dados coletados ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido do teste de Levene de normalidade de variância. A análise simples de variância (one-way ANOVA) seguida do teste de Tukey, a 5% de probabilidade (quando os resultados foram significativos), foi o instrumento de escolha para avaliar dados sobre a massa relativa dos órgãos e os parâmetros registrados no teste de campo aberto. Submetemos os dados apresentando distribuição anormal ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Múltiplas comparações foram realizadas através do teste de Dunn a 5% de probabilidade, no caso de resultados significativos.

A ANOVA de *duas vias* foi usada para analisar dados sobre biomassa corporal, número total de cruzamentos, frequência dos movimentos da cabeça e tempo (s) gasto (s) pelo pintinho na zona de segurança (teste de resposta ao predador), baseado no fatorial arranjo 3×2 . Os fatores avaliados foram “tratamento” (controle, EC1x e EC1000x) e “tempo” (início e fim do experimento). A ANOVA de duas vias, baseada no fator “tratamento”, foi usada para analisar outros parâmetros. Os fatores foram “controle”, EC1x e EC1000x (três níveis); “Estímulo” e “sem estímulo”; e cobra falsa e cobra real (três níveis). Múltiplas comparações foram realizadas através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade, no caso de significância de F. Transformamos os dados não-paramétricos em $\log(x)$, a fim de submetê-los à ANOVA two-way. O software Graphpad Prism 7 (Graphpad - USA) foi utilizado em todos os testes e geração de figuras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Minutos após a aplicação diária das nanopartículas de ZnO , ou durante as sucessivas horas de aplicação, os modelos não apresentaram qualquer sinal clínico de toxicidade, como fraqueza, queda do poleiro e incapacidade de andar, ficar em pé ou voar em linha reta; letargia , cianose , regurgitação / vômito, membranas mucosas pálidas, ataxia, inclinação da cabeça ou cegueira. O exame físico aplicado aos animais comparou as massas inicial e final e mostrou ganho de massa corporal em todos os grupos experimentais (figura. 5A - verifique no “Material Complementar” on-line). Esperávamos que tal resultado acontecesse devido ao crescimento / desenvolvimento dos modelos durante o período de exposição, já que, eles eram mais jovens no início do experimento. Não observamos diferenças entre as massas hepáticas e cerebrais relativas dos animais testados nos grupos experimentais (Figura. 5 B - verifique no “Material Complementar” on-line). Portanto, os tratamentos não afetaram os índices somáticos das aves avaliadas e as nanopartículas de ZnO usadas não causaram sinais típicos de toxicidade nelas.

O teste de campo aberto mediu se as aves que apresentam deficiências locomotoras poderiam ter respostas ruins nos testes subsequentes. Do ponto de vista ecológico, tal resposta poderia implicar perdas de reprodução e termorregulação e colocar em risco a sobrevivência desses animais. Os modelos expostos aos tratamentos não apresentaram déficit locomotor no teste de campo aberto, uma vez que o número total de cruzamentos dos quadrantes não foi diferente entre os grupos experimentais (figura.5A.B). Com base nos dados coletados, os tratamentos não causaram hipoatividade (sedação) ou hiperatividade nas aves avaliadas. Não observamos os efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos causados pelos tratamentos na análise aplicada à locomoção dos animais nos quadrantes centrais - razão total de locomoção animal (índice de ansiedade) (Figura 5B). Com base nos nossos resultados, a exposição a nanopartículas de ZnO, mesmo em doses 1000 vezes superiores às ambientalmente relevantes (EC1000x), não causou alterações nas vias neurais ou em mecanismos que muitas vezes levam à ansiedade. Esse achado foi relevante porque descartou a hipótese de que as respostas aos estímulos predatórios poderiam estar relacionadas ao estado emocional antes do teste. Baseado em Berton et al. (1998), mudanças no estado “emocional” podem ter um efeito negativo nas respostas defensivas anti-predatórias das aves.

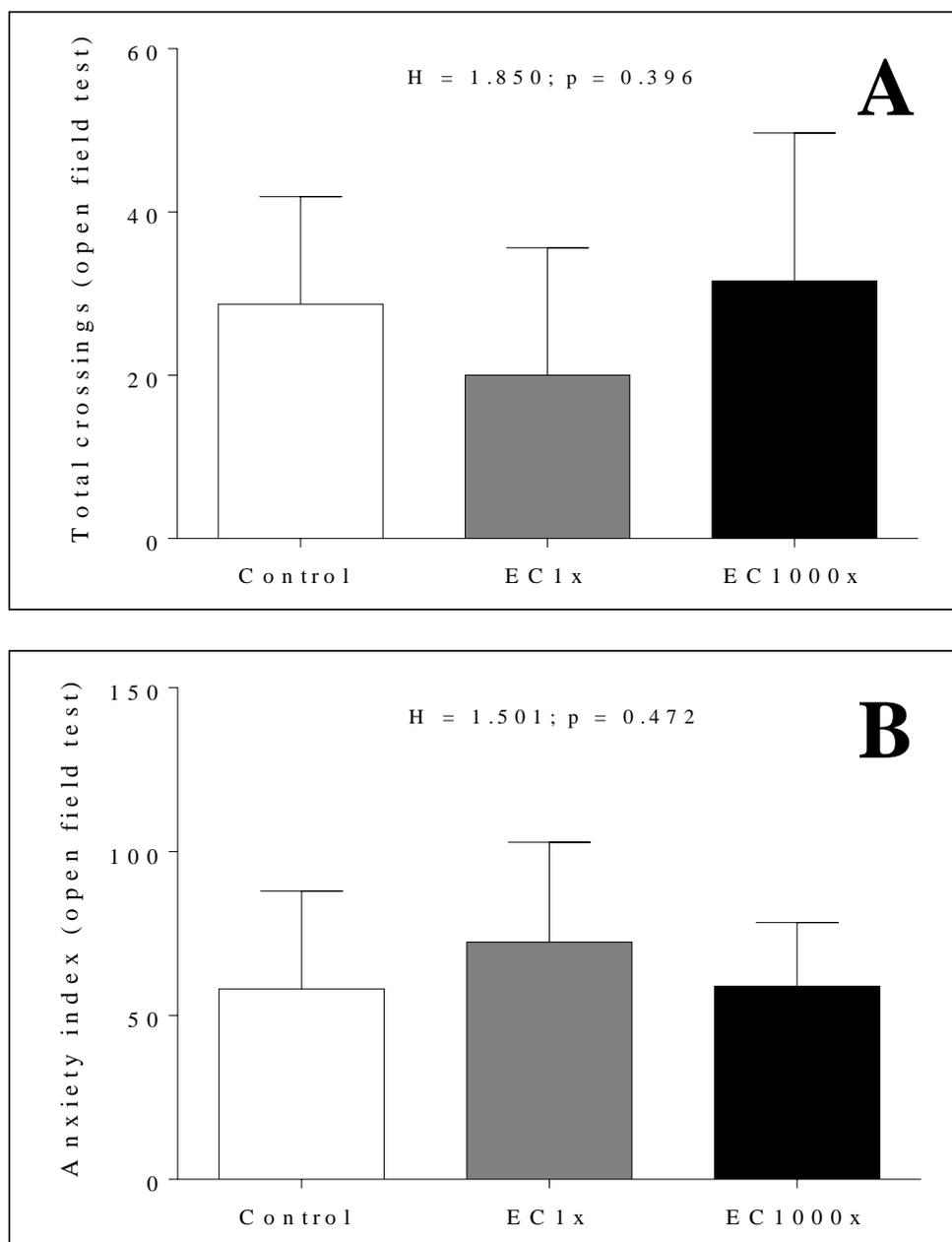


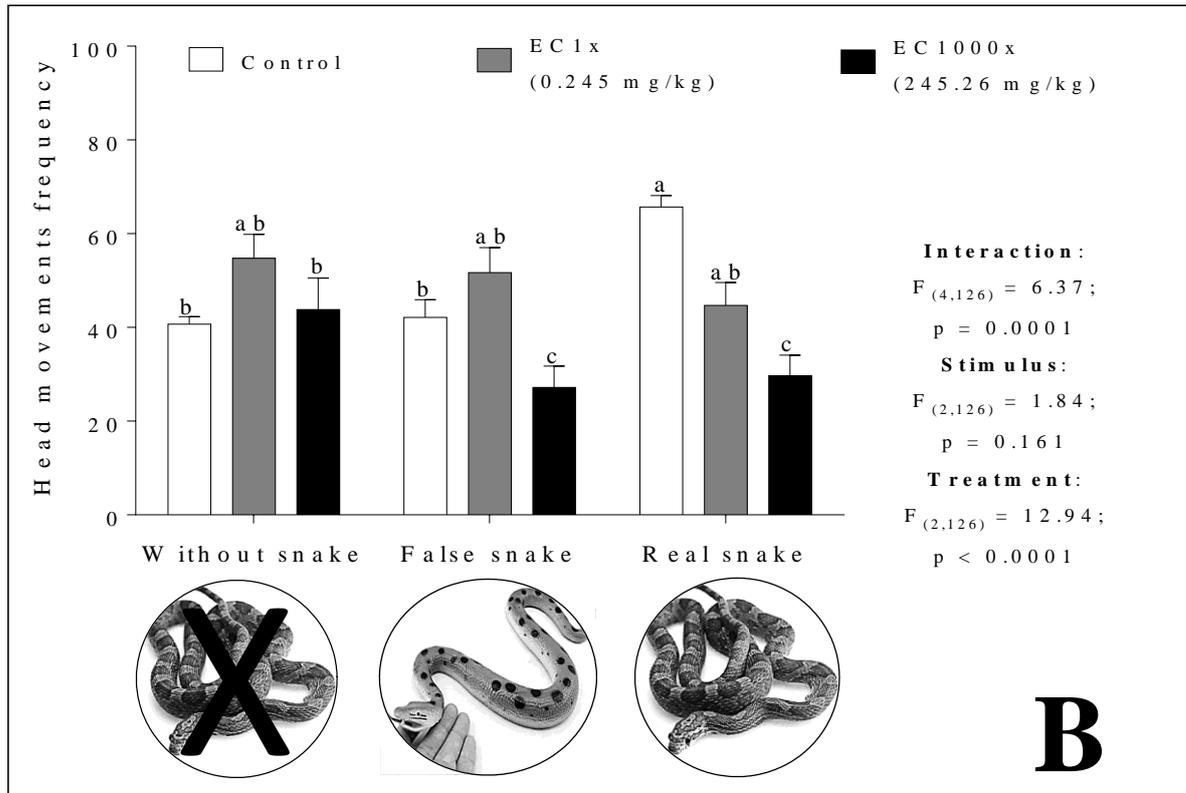
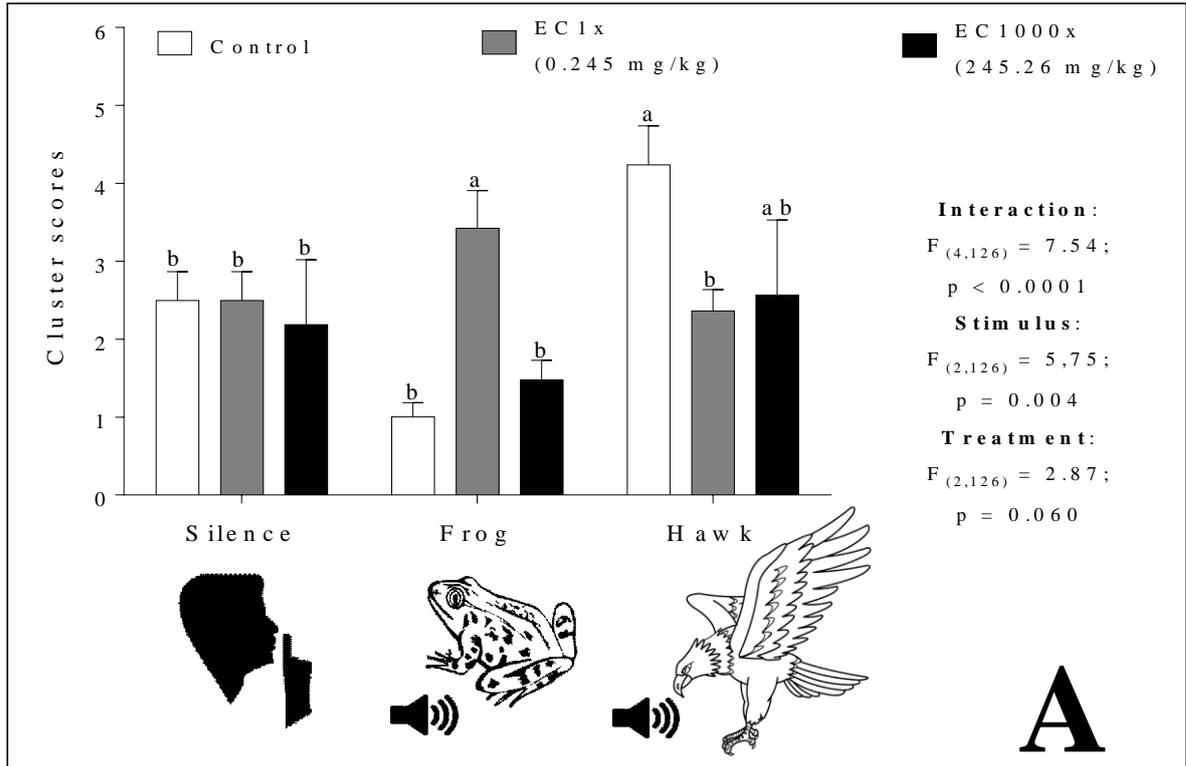
Figura 5. (A) Número total de cruzamentos e (B) índice de ansiedade de pintos expostos, ou não, a diferentes concentrações de nanopartículas de ZnO no teste de campo aberto. Barras indicam a média \pm desvio padrão (SD). Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Concentrações ambientalmente relevantes (EC1x = 245,26 mg kg⁻¹ = 0,245 mg kg⁻¹) (n = 15) e o grupo de animais exposto a altas concentrações de nanopartículas de ZnO (EC1000x = 245,260.00 mg kg⁻¹ = 245,26 mg kg⁻¹) (n = 15).

Os escores dos agrupamentos expostos às nanopartículas de ZnO foram influenciados pelos tratamentos e pelos estímulos predatórios fornecidos aos animais. Aves no grupo EC1x registraram escores mais altos quando o som de um sapo foi reproduzido. Esse comportamento foi inesperado porque os sapos não são predadores naturais de pintinhos. As pontuações registradas durante a vocalização do gavião não diferiram das registradas na sessão sem qualquer estímulo sonoro (figura.

6 A). O grupo exposto à maior concentração de nanopartículas de ZnO (EC1000x) apresentou escores estatisticamente iguais em todas as sessões de teste (Figura. 6 A), diferentemente das aves do grupo controle, que apresentaram apenas comportamento de agregação social.(pontuações mais altas) quando o grunhido de falcão foi jogado na sala de teste. Esses dados validaram o teste realizado e mostraram que a exposição a nanopartículas de ZnO alterou a capacidade desses animais de reconhecer o grunhido-do-falcão como uma indicação de um potencial predador ao redor. Conseqüentemente, este resultado implicou uma resposta defensiva prejudicada, uma vez que as aves usam a agregação social para minimizar a predação (Carrascal et al., 1990).

O déficit de resposta defensiva anti-predatório foi causado pela exposição a nanopartículas de ZnO no teste de resposta do predador ofídico. Nossa análise estatística evidenciou interação entre os fatores “tratamento” e “estímulo” na frequência dos movimentos da cabeça registrados para os modelos. Aves no grupo de controle moviam suas cabeças mais frequentemente na presença da cobra verdadeira, enquanto os animais expostos a nanopartículas de ZnO não mostravam comportamentos diferentes nas sessões de teste (Figura. 6 B). Segundo Müller et al. (2008) , o aumento da frequência de movimentos repetitivos da cabeça em pintinhos recém-nascidos pode ser entendido como um comportamento que evidencia o desespero devido à proximidade de uma ameaça potencial, que pode ser adversamente afetada por vários xenobióticos(Müller et al., 2008).

O tempo gasto pelas aves do controle na zona de segurança na presença da cobra real foi maior do que o tempo gasto nesta zona durante outras sessões de teste. Essa resposta diferiu daquela dos modelos expostos a nanopartículas de ZnO, cujo tempo na zona de segurança não diferiu entre as sessões de teste (Figura. 6 B). Estes resultados evidenciam falhas na percepção dessas aves sobre o risco de ter um potencial predador (cobra real) por perto. A zona de segurança proporcionou grande segurança aos animais (Figura. 3C), uma vez que foi a mais distante do odor e estímulo visual proveniente do predador.



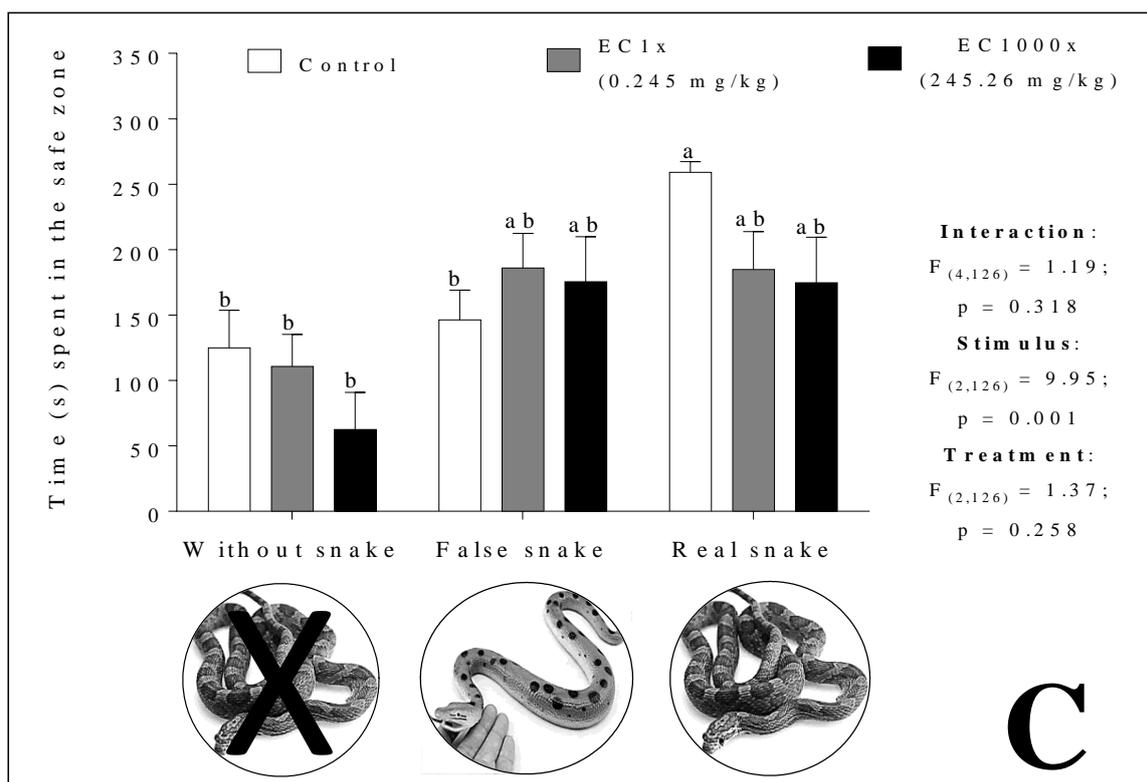


Figura 6. (A) Escores de clusters registrados nos testes de agregação social e (B) frequência dos movimentos da cabeça, e (C) tempo gasto na zona de segurança registrada para pintos expostos, ou não, às nanopartículas de ZnO. Barras representam o desvio padrão médio of dos dados originais, que foram transformados em $\log(x)$ para serem submetidos (a posteriori) a ANOVA de duas vias. Múltiplas comparações no teste post-hoc de Tukey foram realizadas a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas. Concentração ambientalmente relevante (EC1x $\frac{1}{4}$ 245,26 m kg $^{-1}$ $\frac{1}{4}$ 0,245 mg kg $^{-1}$) (n $\frac{1}{4}$ 15) e o grupo de animais expostos a altas concentrações de nanopartículas de ZnO (EC1000x $\frac{1}{4}$ 245,260.00 mkg $^{-1}$ $\frac{1}{4}$ 245.26 mg kg $^{-1}$) (n $\frac{1}{4}$ 15).

A relação entre as nanopartículas de ZnO e o déficit de resposta defensiva anti-predatório observado foi mais evidente quando houve bioacumulação de Zn nos cérebros de aves nos grupos EC1x e EC1000x (Figura. 7). De acordo com nossos resultados, as nanopartículas de ZnO são capazes de superar a barreira hematoencefálica e de atingir o sistema nervoso central desses animais, mesmo em baixas concentrações. Houve correlação positiva e estatisticamente significativa entre “concentração de zinco ($\mu\text{g} / \text{g}$) no cérebro” e “frequência dos movimentos da cabeça” ($r = 0,452$; $p = 0,030$), bem como correlação positiva entre “concentração de zinco ($\mu\text{g} / \text{g}$) no cérebro” e “tempo gasto na zona de segurança” ($r = -0,416$; $p = 0,048$). Obviamente, as concentrações de Zn identificadas nos cérebros das aves são menores que suas concentrações nos animais dos grupos EC1x ($0,245 \text{ mg kg}^{-1}$) e EC1000x ($245,26 \text{ mg kg}^{-1}$). O desfecho Suh pode ser explicado pelo fato de algumas nanopartículas de ZnO se acumularem em outros órgãos, como fígado, baço e rins, ou são simplesmente

excretados. Investigações posteriores podem ajudar a elucidar melhor a rota metabólica tomada pelas nanopartículas de ZnO em modelos expostos a concentrações ambientais relevantes dos mesmos.

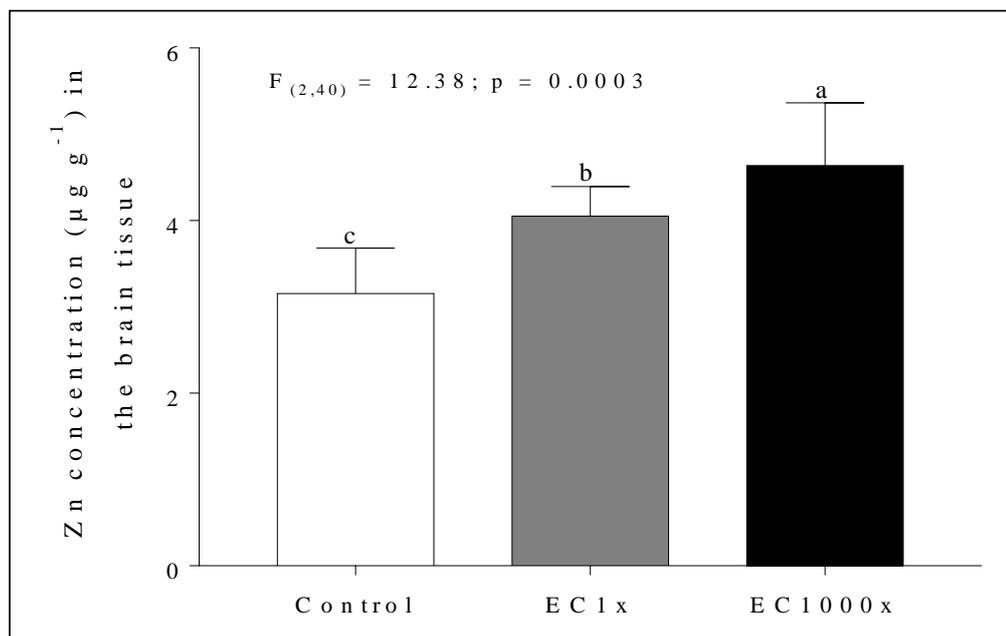


Figura 7. Concentração de Zn (mg g⁻¹) no tecido cerebral de pintos expostos, ou não, a nanopartículas de ZnO. Barras indicam a média ± desvio padrão (SD). Os dados foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) e ao pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Concentrações ambientalmente relevantes (EC1x ¼ 245,26 mg kg⁻¹ ¼ 0,245 mg kg⁻¹) (n ¼ 15) e o grupo de animais exposto a altas concentrações de nanopartículas de ZnO (EC1000x ¼ 245,260.00 mg kg⁻¹ ¼ 2,26 mg e 1) (n = 15).

O achado chave em nosso estudo evidenciou que concentrações ambientalmente relevantes de nanopartículas de ZnO podem afetar o comportamento defensivo antieratrativo de aves que ocasionalmente ingerem água contaminada com esses nanomateriais. A falta de resposta dose-dependente aos parâmetros analisados provou que a exposição a baixas concentrações de nanopartículas de ZnO a curto prazo pode ser tão prejudicial quanto a exposição a concentrações mais altas (1000 vezes maior). A ausência do efeito ansiogênico ou ansiolítico avaliado no teste de campo aberto (fig. 5) também evidenciou que os tratamentos não influenciaram o estado emocional das aves avaliadas. Segundo Egbuniwe et al. (2018), o teste de campo aberto tem sido comumente usado para avaliar os padrões comportamentais das aves e avaliar seu estado emocional, respostas gerais ao medo e motivação para a reintegração social (Forkman et al., 2007). Portanto, nossos dados reforçam a hipótese de que o déficit de resposta defensiva observado nos animais dos grupos EC1x e EC1000x durante os testes de agregação social e resposta predatória está relacionado a falhas nos mecanismos de reconhecimento de potenciais predadores, e não a mecanismos neuromodulatórios aplicados à ansiedade. Ao contrário dos filhotes expostos às nanopartículas de ZnO, as aves do grupo de controle

reconheceram o grunhido do gavião e a ameaça potencial da verdadeira cobra. Eles distinguiram os estímulos de cobra reais daqueles colocados pelo sapo e pela cobra falsa (Fig. 6).

A natureza pioneira do nosso estudo abre perspectivas para uma série de investigações para elucidar como as nanopartículas de ZnO afetam a resposta anti-predatória defensiva das aves e quais outros aspectos biológicos podem ser influenciados por esses nanomateriais. Supostamente, as nanopartículas de ZnO podem ter ação direta nas estruturas cerebrais e/ou no circuito neuromodulador de suas respostas defensivas, uma vez que identificamos concentrações mais altas de Zn nos cérebros das aves expostas do que nos animais do grupo controle. Há evidências de conservação anatômica e molecular do cérebro em vertebrados (Koutcherov et al., 2002 ; Kurrasch et al., 2007 ; Xie & Dorsky, 2017). Esse processo forma o antigo centro de controle das respostas de sobrevivência que remontam à evolução dos bilaterais (Marlow & Arendt, 2014).

Com base em estudos anteriores sobre a expressão de c-fos, que podem ser usados como marcadores de atividade neuronal, as principais estruturas encefálicas recrutadas durante o 'teste de presas versus predador' estão localizadas no hipotálamo . Esse processo envolveu o recrutamento do hipotálamo anterior, a divisão dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial e do núcleo pré-mamilar dorsal (Canteras et al., 1997 ; Canteras & Goto, 1999 ; Canteras et al., 2001). Esses estudos também mostraram que os núcleos estão criticamente envolvidos na organização de respostas defensivas inatas. Esta proposição é baseada na imunorreatividade de ratos expostos a predadores naturais, como gatos e cobras (Canteras et al., 1997 ;Canteras & Goto, 1999 ; Canteras et al., 2001). Outros estudos baseados na estimulação elétrica ou química do sistema de defesa hipotalâmico (Ullah et al., 2015 ; Biagioni et al., 2016) atendem aos achados registrados no 'teste presa versus predador', em que ambos os ataques de pânico registrados para o modelos resultaram em reações de fuga orientadas.

Portanto, é possível afirmar que alterações neurobiológicas causadas por nanopartículas de ZnO podem ter ocorrido em três núcleos hipotalâmicos mediais interconectados, comuns em vertebrados, a saber: o núcleo hipotalâmico anterior (AHN), a divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial (VMHdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMD). Juntos, esses três núcleos compreendem o sistema defensivo hipotalâmico medial (Canteras et al., 2001). Com base nas características estruturais das nanopartículas de ZnO, os potenciais motivos e hipóteses estariam relacionados à capacidade desses nanomateriais gerarem espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como a danos na membrana possivelmente causados pela geração de EROs (Reddy et al., 2007). Estes aspectos nos dão uma idéia sobre o possível modo de ação associado aos efeitos comportamentais observados em animais após a exposição a nanopartículas de ZnO. Estudos anteriores envolvendo outros modelos animais, como o realizado por Du et al. (2016) , foram realizados em diferentes

contextos, mas já mostraram danos causados pela exposição às nanopartículas de ZnO nos mecanismos neurológicos do hipotálamo. Portanto, seus resultados reforçam a associação entre esses nanomateriais e o déficit de resposta defensiva anti-predatório observados nos modelos avaliados.

Baseado em um ponto de vista ecológico, nosso estudo permite inferir como a exposição a nanopartículas de ZnO, mesmo em baixas concentrações por um curto período de tempo, pode alterar a dinâmica das populações de aves que vivem perto de sistemas aquáticos contaminados com nanopartículas de ZnO. Mudanças no comportamento das aves avaliadas podem comprometer a sobrevivência e o desenvolvimento / crescimento desses indivíduos, bem como seu sucesso reprodutivo, uma vez que essas nanopartículas os tornam mais vulneráveis a potenciais predadores. Assim, é fundamental ter um entendimento mais amplo sobre o comportamento anti-predador, avaliando o comportamento de defesa da cria ao longo da criação.

4. CONCLUSÃO

Os modelos foram afetados pela exposição mínima a baixas concentrações de nanopartículas de ZnO (ou seja: concentração ambientalmente relevante prevista). Este resultado confirma nossa hipótese inicial, porque os transtornos do comportamento anti- predatório podem afetar a aptidão da presa e a dinâmica populacional . Sugerimos futuros estudos focados não apenas nos mecanismos biológicos que levam às mudanças observadas, mas também em seus possíveis impactos na saúde de aves expostas ao consumo de água contaminada com nanopartículas de ZnO.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almansour, M.I., Alferah, M.A., Shraideh, Z.A., Jarrar, B.M., 2017 Apr. Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: histological and histochemical study. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 51, 124e130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.015>. Epub 2017 Feb 16.
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology** 17, 387e395.
- Berton, F., Vogel, E., Belzung, C., 1998 Nov 15. Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. **Physiol. Behav.** 65 (2), 247e254.
- Biagioni, A.F., de Oliveira, R.C., de Oliveira, R., da Silva, J.A., dos Anjos-Garcia, T., Roncon, C.M., et al., 2016. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception. **Eur. Neuropsychopharmacol** 26, 532e545.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., Kahru, A., 2013 Jul. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Arch. Toxicol.** 87 (7), 1181e1200. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>. Epub 2013 Jun 1.
- Boxall, A.B.A., Chaudhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B., Watts, C., 2007. Current and Future Predicted Environmental Exposure to Engineered Nanoparticles. **Central Science Laboratory**, York.
- Canteras, N.S., Goto, M., 1999. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport** 10, 413e418.
- Canteras, N.S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L.E., Swanson, L.W., 1997. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res. Bull.** 44, 297e305.
- Canteras, N.S., Ribeiro-Barbosa, E.R., Comoli, E., 2001. Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear response. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 25, 661e668.
- Cardoso, L.S., Estrela, F.N., Chagas, T.Q., da Silva, W.A.M., Costa, D.R.O., Pereira, I., Vaz, B.G., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G., 2018 Mar. The exposure to water with cigarette residue changes the anti-predator response in female Swiss albino mice. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** 25 (9), 8592e8607. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1150-4>. Epub 2018 Jan 9.
- Caro, T., 2005. Antipredator Defenses in Birds Andmammals. University of Chicago Press, Chicago.
- Carrascal, L.M., Alonso, J.C., Alonso, J.A., 1990. Aggregation size and foraging behaviour of White stork *Ciconia cinconia* during the breeding season. **Ardea** 78, 399e404.
- Carvalho, M.C., Nazari, E.M., Farina, M., Muller, Y.M., 2008 Nov. Behavioral, morphological, and biochemical changes after in ovo exposure to methylmercury in chicks. **Toxicol. Sci.** 106 (1), 180e185. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn158>. Epub 2008 Aug 6.
- Collins, L.M., Asher, L., Pfeiffer, D.U., Browne, W., Nicob, C., 2011. Clustering and synchrony in laying hens: the effect of environmental resources on social dynamics. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 129, 43e53.

Du, J., Wang, S., You, H., Liu, Z., 2016 Sep. Effects of ZnO nanoparticles on perfluorooctane sulfonate induced thyroid-disrupting on zebrafish larvae. **J. Environ. Sci.** (China) 47, 153e164. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.018>. Epub 2016 Mar 9.

Dumont, E., Johnson, A.C., Keller, V.D.J., Williams, R.J., 2015. Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters e Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution. **Environ. Pollut.** 196, 341e349.

Egbuniwe, I.C., Ayo, J.O., Kawu, M.U., Mohammed, A., 2018 Feb 5. Behavioral and hematological responses of broiler chickens administered with betaine and ascorbic acid during hot-dry season. **J. Appl. Anim. Welfare Sci.** 1e13. <https://doi.org/10.1080/10888705.2018.1426000> ([Epub ahead of print]).

Espitia, P.J.P., Soares, N.F.F., Coimbra, J.S.R., Andrade, N.J., Cruz, R.S., Medeiros, E.B.A., 2012. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food Bioprocess Technol.** 5, 1447e1464.

Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.C., Canali, E., Jones, R.B., 2007 Oct 22. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiol. Behav.** 92 (3), 340e374.

Formanek, L., Houdelier, C., Lumineau, S., Bertin, A., Caban_es, G., Richard-Yris, M.A., 2008. Selection of social traits in juvenile Japanese quail affects adult's behaviour. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 112, 174e186.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environmental Science & Technology** 43 (24), 9216e9222.

Gul, S.T., Khan, A., Ahmad, M., Anwar, M.F., Khatoon, A., Sallemi, M.K., Akram, M.N., 2017. Effect of sub-lethal doses of thiamethoxam (a neonicotinoid) on hematobiochemical parameters in broiler chicks. **Toxin Rev.** 1e5 <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1336731>.

Hou, J., Wu, Y., Li, X., Wei, B., Li, S., Wang, X., 2018. Toxic effects of different types of zinc oxide nanoparticles on algae, plants, invertebrates, vertebrates and microorganisms. **Chemosphere** 193, 852e860.

Jaspers, V.L.B., 2015. Selecting the right bird model in experimental studies on endocrine disrupting chemicals. **Front. Environ. Sci.** 3, 1e7.

Koutcherov, Y., Mai, J.K., Ashwell, K.W., Paxinos, G.J., 2002 May 13. Organization of human hypothalamus in fetal development. **Comp. Neurol.** 446 (4), 301e324.

Kurrasch, D.M., et al., 2007. The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. **J. Neurosci.** 27, 13624e13634 ([PubMed]).

Marlow, H., Arendt, D., 2014. Evolution: ctenophore genomes and the origin of neurons. **Curr. Biol.** 24, R757eR761.

Maziarz, M., Piggott, C., Burgess, M., 2018. Predator recognition and differential behavioural responses of adult wood warblers *Phylloscopus sibilatrix*. **Acta Ethol.** 21, 13e20.

McCall, M.J., 2011. Environmental, health and safety issues: nanoparticles in the real world. **Nat. Nanotechnol.** 6 (10), 613e614.

Mendes, B.O., Rabelo, L.M., E Silva, B.C., de Souza, J.M., da Silva Castro, A.L., da Silva, A.R., de Lima Rodrigues, A.S., Malafaia, G., 2017 Aug. Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity, and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** 24 (23), 19234e19248. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9504-5>. Epub 2017 Jun 30.

Montgomerie, R.D., Weatherhead, P.J., 1988. Risks and rewards of nest defence by parent birds. **Q. Rev. Biol.** 63, 167e187. <https://doi.org/10.1086/415838> ([Cross Ref] [Ref list]).

Müller, Y.M., Rivero, L.B., Carvalho, M.C., Kobus, K., Farina, M., Nazari, E.M., 2008 Jul. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. **Arch. Toxicol.** 82 (7), 445e451. Epub 2007 Dec 21.

Parker, M.O., Annan, L.V., Kaneellooulos, A.H., Brock, A.J., Baiamonte, M.B., The, M.T., Brennan, C.H., 2017. The utility of zebrafish to study the mechanisms by which ethanol affects social behavior and anxiety during early brain development. **Environ. Sci. Pollut. Control Ser.** 24, 19234e19248.

Pati, R., Das, I., Mehta, R.K., Sahu, R., Sonawane, A., 2016 Apr. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. **Toxicol. Sci.** 150 (2), 454e472. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw010>. Epub 2016 Jan 21.

Ricklefs, R.E., 1969. The nesting cycle of songbirds in tropical and temperate regions. **Living Bird.** 8, 165e175.

Reddy, K.M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D.G., Hanley, C., Punnoose, A., 2007. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl. Phys. Lett.* 90 (21), 213902.

Santos, W.M., Rosado, F.R., 2009. Dados preliminares da biologia do Gavi~ao-carij_o (*Rupornis magnirostris*, Gmelin, 1788) na Regi~ao noroeste do Paran_a. In: **Revista em Agroneg_ocios e Meio Ambiente**, 2, pp. 421e430.

Sheida, E., Sipailova, O., Miroshnikov, S., Sizova, E., Lebedev, S., Rusakova, E., Notova, S., 2017 Mar. The effect of iron nanoparticles on performance of cognitive tasks in rats. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.** 24 (9), 8700e8710. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8531-6>. Epub 2017 Feb 16.

Smijs, T., Pavel, S., 2011. Titanium oxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. **J. Nanotech. Sci. Appl.** 4, 95e112.

Souza, J.M., Mendes, B.O., Guimar~aes, A.T.B., Rodrigues, A.S.L., Chagas, T.Q., Rocha, T.L., Malafaia, G., 2018a. Zinc oxide nanoparticles in predicted environmentally relevant concentrations leading to behavioral impairments in male swiss mice. **Sci. Total Environ.** 613e614, 653e662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.051>. Epub 2017 Sep. 26. (Accessed 1 February 2018).

Souza, J.M., Rabelo, L.M., de Faria, D.B.G., Guimar~aes, A.T.B., da Silva, W.A.M., Rocha, T.L., Estrela, F.N., Chagas, T.Q., de Oliveira Mendes, B., Malafaia, G., 2018b. The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice. **Sci. Total Environ.** 628e629, 186e197. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.040>. Epub 2018 Feb 13. (Accessed 1 July 2018).

Sun, T.Y., Gottschalk, F., Hungerbuhler, K., Nowack, B., 2014. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.* 185, 69e76.

Ullah, F., dos Anjos-Garcia, T., dos Santos, I.R., Biagioni, A.F., Coimbra, N.C., 2015. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behav. Brain Res.** 293, 143e152.

Vanderiel, R., Jong, W., 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. **Nanotechnol. Sci. Appl.** 5, 61e71.

- Wang, C., Cheng, K., Zhou, L., He, J., Zheng, X., Zhang, L., Zhong, X., Wang, T., 2017 Jan 24. Evaluation of long-term toxicity of oral zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in mice. **Biol. Trace Elem. Res.** <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0934-1> ([Epub ahead of print]).
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Madler, I., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J., Zink, J., Nel, A., 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. **ACS Nano** 2 (10), 2121e2134.
- Xie, Y., Dorsky, R.I., 2017. Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. **Development** 144, 1588e1599.
- Yang, M., Augustsson, H., Markham, C.M., Hubbard, D.T., Webster, D., Wall, P.M., Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 2004. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiol. Behav.** 8, 465e473.
- Zvyagin, A.V., Zhao, X., Gierden, A., Sanchez, W., Ross, J.A., Roberts, M.S., 2008. Imaging of zinc oxide nanoparticles penetration in human skin in vitro and in vivo. **J. Biomed. Optic.** 13 (6), 064031.