

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 15/12/2021.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO NO SISTEMA IMUNE INATO DE
Coturnix coturnix japonica

GABRIEL MELHADO

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Zoologia.

Rio Claro-SP

2020

GABRIEL MELHADO

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO NO SISTEMA IMUNE INATO
DE *Coturnix coturnix japonica***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto

Rio Claro – SP
2020

M521e Melhado, Gabriel
Efeitos da contaminação por chumbo no sistema imune inato de Coturnix coturnix japonica / Gabriel Melhado. -- Rio Claro, 2020
37 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Ariovaldo Pereira da Cruz Neto

1. Fisiologia. 2. Sistema imunológico. 3. Codornas. 4. Poluição. 5. Chumbo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO
NO SISTEMA IMUNE INATO DE Coturnix coturnix japonica**

AUTOR: GABRIEL MELHADO

ORIENTADOR: ARIIVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ARIIVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO (Participação Virtual)
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES (Participação Virtual) Instituto de
Biociências / Universidade de São Paulo - SP

Profa. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UNESP/Câmpus de
Jaboticabal

Rio Claro, 15 de dezembro de 2020

aos meus pais e melhores amigos Helena Evangelista
Melhado e Valter Melhado. Foram eles que me
conduziram e me trouxeram paz em todo o meu
percurso até aqui
ao meu irmão de sangue, Lucas Melhado, aquele que
carrega o meu maior amor e admiração
à minha amada companheira, Luiza Freitas Silva, que
escolheu compartilhar seu brilho comigo e caminhar
sempre ao meu lado
DEDICO.

**“Se não podes entender, crê para que entendas. A fé
precede, o intelecto segue.”
Santo Agostinho**

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, que criou todos os seres e nos presenteou com a vida para que pudéssemos ser ferramentas em suas mãos para estudar, compreender e proteger a natureza de sua obra.

Sem dúvidas foram anos de teste da minha fé, pois meu caminho teve nuances que não estavam em meu planejamento. Porém, se cheguei até aqui foi graças a Ele que projetou todas as experiências que eu deveria viver e o conhecimento que eu deveria aprender e compartilhar.

Ao meu orientador, Ariovaldo Pereira da Cruz Neto, pela figura de professor e mestre.

À Professora Dr^a. Renata Guimarães Moreira Whitton pelas correções, ideias e sugestões dadas na qualificação que enriqueceram esse trabalho.

Ao querido Professor Dr. Amauri Antonio Menegário, pela paciência, acolhida, alegria, discussões de futebol e apoio total a esta presente contribuição científica. Sinto-me em casa quando estou no CEA.

Ao meu padrinho da ciência, Tiago Gabriel Correia (TG), por todas as oportunidades oferecidas, confiança, carinho, companheirismo, ensinamentos, aventuras pelo Brasil, ideias e correções que foram fundamentais para a realização dessa pesquisa.

Ao meu grande amigo Ayrton Nascimento (um dos maiores presentes que ganhei com essa pesquisa), pela ajuda nos experimentos, pelos projetos visionários, pelas aulas de finanças, pelas tardes de futebol (e domínio do Marcelo), pela companhia, pela amizade, pelas ideias e conhecimento.

Aos meus amigos do CEA (Centro de Estudos Ambientais) que me instruíram, me ensinaram um novo mundo na ciência e me acolheram. Em especial ao meu amigo Jorge Henrique Pedrobom, que foi um grande professor e amigo durante esse mestrado.

A todos os meus colegas do LaFA (Laboratório de Fisiologia Animal – UNESP Rio Claro) que me ajudaram e preencheram meus dias com boas conversas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2014/16320-7.

Ao Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), em Rio Claro, pelas facilidades logísticas.

À minha família maravilhosa que sempre me deu suporte em minha busca por novos sonhos.

À minha amada esposa, Luiza Freitas Silva (Preta), que me ajudou em todas as etapas desse projeto e me amou mesmo nos momentos mais desafiadores que passei. Meu porto seguro.

Às minhas rezadeiras, que elevaram preces em meu bem maior.

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

As aves tem apresentado um declínio populacional nas últimas décadas ligado as atividades antrópicas, como industrialização, atividades agrícolas e processo de urbanização. Associada a essas atividades, a poluição por metais tem aumentado, evidenciada principalmente pela presença do chumbo (Pb) nos ecossistemas em elevadas concentrações. A preocupação perante à poluição por Pb é decorrente da capacidade de bioacumulação e toxicidade desse metal, e seu potencial efeito deletério sobre a saúde e sobrevivência das aves. Por exemplo, exposição ao Pb pode acarretar em um declínio na condição corpórea e alterações em processos fisiológicos que mantém a homeostase desses animais, como disfunção nas respostas imunológicas. No presente estudo, analisamos os efeitos do Pb sobre parâmetros indicativos da condição geral de saúde e elementos constitutivos e resposta imunológica induzida em codornas (*Coturnix coturnix japonica*). Para tanto, avaliamos os efeitos do Pb sobre a massa corpórea, consumo alimentar, número de células brancas, razão heterofilo/linfócito e produção da proteína haptoglobina. O Pb mostrou afetar a reposta imune constitutiva e a homeostase das aves à medida que codornas contaminadas por Pb tiveram aumento do número total de leucócitos. Além disso, os efeitos da contaminação por Pb em respostas induzidas do sistema imunológico podem estar associados a efeitos horméticos, já que houve aumento dos leucócitos, da razão H/L e da produção de haptoglobina, em aves contaminadas pelo metal e desafiadas imunologicamente com injeção de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: haptoglobina, chumbo, metal, resposta imune, hormese.

ABSTRACT

Birds have shown a population decline in recent decades related to human activities, such as industrialization, agricultural activities and the urbanization process. Associated with these activities, chemical pollution by metals has increased, evidenced mainly by the presence of lead (Pb) in natural ecosystems in high concentrations. The concern regarding Pb pollution is due to its bioaccumulation capacity and toxicity, and its potential deleterious effect on the birds' health and survival. For example, exposure to Pb can lead to a decline in body condition and changes in physiological processes that maintain homeostasis in these animals, such as dysfunction of immune responses. In the present study, we analyzed the effects of Pb on parameters indicative of general health condition and constitutive elements and induced immune response in quails (*Coturnix coturnix japonica*). For this purpose, we evaluated the effects of Pb on body mass, food intake, total number of white cells, heterophil/lymphocyte ratio and production of the protein haptoglobin. Pb has been shown to affect the constitutive immune response and avian homeostasis as quails contaminated by Pb have increased the total number of leukocytes. In addition, the effects of Pb contamination on induced responses of the immune system may be associated with hormetic effects, since there was an increase in leukocytes, the H/L ratio and the production of haptoglobin, in birds contaminated by the metal and immunologically challenged with injection of lipopolysaccharide from *Escherichia coli*.

Key-words: haptoglobin, lead, metal, immune response, hormesis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	14
ABSTRACT	17
INTRODUCTION	18
MATERIAL AND METHODS	20
<i>Animal housing</i>	20
<i>Experimental Protocols</i>	20
<i>Body mass and food intake</i>	21
<i>White blood cell (WBC) and Haptoglobin (Hp)</i>	21
<i>Lead concentration</i>	22
<i>Data Analysis</i>	22
RESULTS.....	23
<i>Effects of Pb exposure on birds' welfare and constitutive component of immune system</i>	23
<i>Effects of Pb exposure on induced immune response</i>	23
DISCUSSION.....	24
ACKNOWLEDGMENTS.....	27
REFERENCES.....	28
FIGURES CAPTION.....	33
FIGURES.....	34
SUPPLEMENTARY MATERIALS.....	36

INTRODUÇÃO GERAL

As atividades antrópicas tem desempenhado pressões no meio ambiente que culminaram no atual padrão global de perda de biodiversidade. Como principais causas dessa tendência temos a fragmentação, deterioração e sobre-exploração do habitat, introdução de espécies invasoras, poluição e mudanças climáticas (Gaston et al., 2003; MEA, 2005). Tais atividades não são distribuídas uniformemente e podem ter efeitos sinérgicos sobre diferentes táxons, uma vez que são desempenhadas concomitantemente nos habitats (Brook et al., 2008).

As aves correspondem ao táxon com maior diversidade de funções ecológicas dentre os vertebrados e são responsáveis por muitos serviços ecossistêmicos, que beneficiam o bem-estar humano (Sekercioglu, 2006). No entanto, elas também são um dos grupos que foram maior e negativamente impactados por alterações no meio ambiente causadas pelo homem (Gaston et al., 2003; Newbold et al., 2015; Northrup et al., 2019). A população global de aves tem apresentado um declínio de 20% nas últimas décadas (Gaston et al., 2003), associado principalmente as mudanças climáticas e uso do solo (Gaston et al., 2003). No entanto, a análise em larga escala sugere fortemente que a alteração do habitat causada pelo homem é, de fato, o principal fator subjacente ao padrão observado de declínio da população de aves (Eglington and Pearce-Higgins, 2012; Gaston et al., 2003). Dada a importância ecológica das aves, entender os efeitos das atividades antrópicas na redução populacional e da perda da diversidade de espécies, é fundamental para prever futuros cenários afim de planejar ações de proteção e conservação dos animais (Chown and Gaston, 2008).

Não obstante as causas específicas por trás da alteração do habitat, a poluição química por metais é um subproduto conspícuo dessas atividades, ao participar no desenvolvimento de novas tecnologias, intenso processo de urbanização e atividades agropecuárias (Wang and Chen, 2009). Uma vez nos ecossistemas, os metais são capazes de contaminar corpos d'água, solo e o ar. A toxicidade desses químicos nos animais expostos é potencializada por seus efeitos cumulativos ao longo da cadeia alimentar (Dedourge-Geffard et al., 2009; Nolet et al., 1994; Rajeshkumar and Li, 2018; Roggeman et al., 2013).

Dentre os metais encontrados em elevadas concentrações na natureza, o chumbo (Pb) está entre os mais tóxicos e é de especial preocupação (Plaza et al., 2018). O Pb provém principalmente da fabricação de baterias, minas extrativistas, queima e processamento de combustíveis fósseis, despejos de lixo e projéteis de armas de fogo (Hoffman et al., 1985; Singh et al., 1994). A contaminação por Pb tem sido relacionada a milhões de mortes anuais na população mundial de aves aquáticas e terrestres (De Francisco et al., 2003). Qualquer que seja a atividade antropogênica subjacente a um aumento de Pb no ambiente, os efeitos da contaminação por Pb têm sido amplamente associados ao declínio da população global de aves.

Como outros vertebrados terrestres, a principal fonte de exposição ao Pb para as aves é a ingestão (Fisher et al., 2006). Quando ingerido, o Pb é absorvido pelos intestinos, acumula-se no sangue e, subsequentemente, em diferentes órgãos e tecidos, comprometendo as funções de diversos sistemas (nervoso, digestivo e reprodutivo - Burger, 1995; Fisher et al., 2006; Mehrota et al., 2008). Em aves, a meia-vida do Pb no sangue é de 13 a 15 dias (Fry and Maurer, 2003; Pain, 2009), enquanto órgãos como o fígado e os rins geralmente retêm o Pb por vários meses após a ingestão (Rainio et al., 2015). Portanto, os efeitos tóxicos da bioacumulação de Pb na saúde das aves dependem, de fato, da interação entre a concentração de Pb e o grau de exposição (agudo ou crônico). Por exemplo, a exposição aguda a baixas concentrações de Pb causa mudanças hematológicas sutis, mas se essa concentração aumentar e/ou persistir por longos períodos, o Pb se acumula nos tecidos e pode interromper gravemente os processos básicos associados à capacidade das aves de manter a homeostase (Vallverdú-Coll et al., 2019).

Em meio aos processos básicos de manutenção da homeostase, o sistema imunológico desempenha funções fundamentais na proteção dos animais contra traumas, infecções e agentes estressores externos. Entretanto, o Pb é associado, dentre outros efeitos tóxicos, a capacidade imunossupressora (Fair and Ricklefs, 2002; Fisher et al., 2006; Ma, 1989; Nain and Smits, 2011; Scheuhammer, 1987). A contaminação por Pb acarreta em alterações em componentes que atuam na manutenção e ativação do sistema imunológico das aves, ao passo que modifica a atuação das respostas humoral e celular (Fair and Ricklefs, 2002; Kenow et al., 2010; Lewis et al., 2013).

Muitas dessas disfunções no sistema imunológico correspondem às alterações dos componentes que atuam durante a resposta imune inata, a qual funciona como a primeira linha de defesa contra processos infecciosos (Abbas, 2015). Nas primeiras horas de infecção, o sistema imune inato combate a proliferação de patógenos por meio da ativação do seu principal componente: a Resposta de Fase Aguda (RFA).

A RFA envolve a produção e mobilização de elementos celulares e proteínas de fase aguda, além de acionar uma cascata de respostas fisiológicas e comportamentais (i.e. diminuição na massa corpórea, frequência alimentar e aumento na produção de leucócitos), que simultaneamente otimizam o processo de contenção e eliminação de patógenos (Baumann and Gauldie, 1994; Cray et al., 2009; Owen-Ashley and Wingfield, 2007). Grasman e Scanlon (1995) observaram aumento da razão heterofilo/linfócito e redução na produção de anticorpos em codornas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas de 100 a 400 µg/ml de Pb na água durante 7 dias. Os efeitos de supressão do sistema imunológico também foram observados em aves aquáticas (*Anas platyrhynchos* - Rocke and Samuel, 1991) e terrestres (*Gallus gallus* - Bunn et al., 2000) após serem expostos a pequenos grãos de Pb (5 a 10 µg), à medida que essas aves reduziram a produção de células brancas no sangue.

Esses estudos avaliaram os efeitos do Pb *per si* nos elementos constitutivos, responsáveis pela manutenção do sistema imune e homeostase das aves. Entretanto, mesmo sabendo dos efeitos do Pb sobre os elementos constitutivos, pouco se sabe sobre os efeitos da contaminação por esse metal na imunocompetência das aves diante de um processo infeccioso. De fato, estudos que avaliaram a ativação do sistema imunológico de aves silvestres em áreas contaminadas por Pb sugerem interações entre Pb e doenças infecciosas (Locke and Bagley, 1967; Rocke and Samuel, 1991).

Portanto, com o intuito de entender a influência do Pb não só nos elementos constitutivos do sistema imunológico, mas também na ativação e atuação do mesmo no combate de doenças infecciosas, nós avaliamos codornas (*Coturnix coturnix japonica*) expostas ao Pb e posteriormente induzidas à ativação de respostas imunes inatas por meio da injeção de lipopolissacarídeo (LPS). Nossos resultados sugerem que a contaminação por Pb tem efeitos na resposta imunológica constitutiva, à medida que aumenta a

produção de células brancas do sangue. Ademais, o Pb também alterou respostas imunológicas induzidas pelo aumento dos leucócitos, da razão H/L e da produção de haptoglobina. Tais aumentos desses componentes atuantes na resposta imune inata podem estar associadas a um efeito hormético do Pb no processo de ativação do sistema imunológico das aves.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. **Imunologia Celular e Molecular 8ED**. 8th. ed. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro Elsevier, 2015.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, n. 2, p. 74–80, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569994901376%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512342%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569994901376%255Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512342>>.
- BROOK, B. W.; SODHI, N. S.; BRADSHAW, C. J. A. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, n. 8, p. 453–460, 2008.
- BUNN, T. L.; MARSH, J. A.; DIETERT, R. R. Gender differences in developmental immunotoxicity to lead in the chicken: Analysis following a single early low-level exposure in ovo. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 61, n. 8, p. 677–693, 2000.
- BURGER, J. Invited review: A risk assessment for lead in birds. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 45, n. 4, p. 369–396, 1995.
- CHOWN, S. L.; GASTON, K. J. Macrophysiology for a changing world. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1642, p. 1469–1478, 2008.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute Phase Response in Animals : A Review. **Laboratory Animal Science**, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.
- DE FRANCISCO, N.; RUIZ TROYA, J. D.; AGÜERA, E. I. Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. **Avian Pathology**, v. 32, n. 1, p. 3–13, 2003.
- DEDOURGE-GEFFARD, O. et al. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. **Chemosphere**, v. 77, n. 11, p. 1569–1576, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.042>>.
- EGLINGTON, S. M.; PEARCE-HIGGINS, J. W. Disentangling the relative importance of changes in climate and land-use intensity in driving recent bird population trends. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2012.
- FAIR, J. M.; RICKLEFS, R. E. Physiological, growth, and immune responses of Japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42,

n. 1, p. 77–87, 2002.

FISHER, I. J.; PAIN, D. J.; THOMAS, V. G. A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. **Biological Conservation**, v. 131, n. 3, p. 421–432, 2006.

FRY, D. M.; MAURER, J. R. Assessment of Lead Contamination Sources Exposing California Condors. n. July, p. 1–85, 2003.

GASTON, K. J.; BLACKBURN, T. M.; KLEIN GOLDEWIJK, K. Habitat conversion and global avian biodiversity loss. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1521, p. 1293–1300, 2003.

GRASMAN, K. A.; SCANLON, P. F. Effects of acute lead ingestion and diet on antibody and T-cell-mediated immunity in Japanese quail. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 161–167, 1995.

HOFFMAN, D. J. et al. Biochemical and hematological effects of lead ingestion in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). **Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology**, v. 80, n. 2, p. 431–439, 1985.

KENOW, K. P. et al. Effects of methylmercury exposure on the behavior of captive-reared common loon (*Gavia immer*) chicks. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 5, p. 933–944, 2010.

LEWIS, C. A. et al. Decreased immune response in zebra finches exposed to sublethal doses of mercury. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 327–336, 2013.

LOCKE, L. N.; BAGLEY, G. E. Case Report : Cooeidiosis and Lead Poisoning in Canada Geese. **Chesapeake Science**, n. 8, p. 68–69, 1967. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/1350358>>.

MA, W. chun. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 617–622, 1989.

MEHROTA, V.; SAXENA, V. L.; SAXENA, A. K. Impact of different doses of lead on internal organs of quail. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. March, p. 147–149, 2008. Disponível em: <http://jeb.co.in/journal_issues/200803_mar08/paper_03.pdf>.

NAIN, S.; SMITS, J. E. G. Subchronic lead exposure, immunotoxicology and increased disease resistance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 787–792, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.045>>.

NEWBOLD, T. et al. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 45–50, 2015.

NOLET, B. A.; DIJKSTRA, V. A. A.; HEIDECKE, D. Cadmium in beavers translocated from the Elbe river to the rhine/meuse estuary, and the possible effect on population growth rate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 154–161, 1994.

- NORTHRUP, J. M. et al. Synergistic effects of climate and land-use change influence broad-scale avian population declines. **Global Change Biology**, v. 25, n. 5, p. 1561–1575, 2019.
- OWEN-ASHLEY, N. T.; WINGFIELD, J. C. Acute phase responses of passerine birds: Characterization and seasonal variation. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. SUPPL. 2, p. 583–591, 2007.
- PAIN, D. A Global Update of Lead Poisoning in Terrestrial Birds from Ammunition Sources. p. 99–118, 2009.
- PLAZA, P. I. et al. A review of lead contamination in South American birds: The need for more research and policy changes. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 201–207, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pecon.2018.08.001>>.
- RAINIO, M. J. et al. Effects of early-life lead exposure on oxidative status and phagocytosis activity in great tits (*Parus major*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 167, p. 24–34, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.08.004>>.
- RAJESHKUMAR, S.; LI, X. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 288–295, 2018.
- ROCKE, T. E.; SAMUEL, M. D. Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. **Journal of wildlife diseases**, v. 27, n. 1, p. 1–9, 1991.
- ROGGEMAN, S. et al. Metal exposure and accumulation patterns in free-range cows (*Bos taurus*) in a contaminated natural area: Influence of spatial and social behavior. **Environmental Pollution**, v. 172, n. 2013, p. 186–199, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.006>>.
- SCHEUHAMMER, A. M. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. **Environmental Pollution**, v. 46, n. 4, p. 263–295, 1987.
- SEKERCIOGLU, C. H. Increasing awareness of avian ecological function. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 8, p. 464–471, 2006.
- SINGH, B. et al. Impact of lead pollution on the status of other trace metals in blood and alterations in hepatic functions. **Biological Trace Element Research**, v. 40, n. 1, p. 21–29, 1994.
- VALLVERDÚ-COLL, N. et al. Immunotoxic effects of lead on birds. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 505–515, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.251>>.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>>.