



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Efeitos tóxicos de compostos de vanádio utilizados no tratamento do diabetes sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de *zebrafish (Danio rerio)*

TIAGO QUEIROZ DA MOTA BITTENCOURT

Recife – PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B624e Bittencourt, Tiago Queiroz da Mota.
Efeitos tóxicos de compostos de vanádio utilizados no tratamento do diabetes sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*) / Tiago Queiroz da Mota Bittencourt. – 2017.
48 f : il.

Orientadora: Marleyne José Afonso Aciolly Lins Amorim.
Coorientador: Pabyton Gonçalves Cadena.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical Recife, BR-PE, 2017.
Inclui anexo(s), apêndice(s) e referências.

1. Vanádio 2. Zebrafish 3. Teste de toxicidade aguda e crônica 4. Efeitos teratogênicos 5. Comportamento animal
I. Amorim, Marleyne Jose Afonso Aciolly Lins , orient.
II. Cadena, Pabyton Gonçalves, coorient. III. Título.

CDD 636.089



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

TIAGO QUEIROZ DA MOTA BITTENCOURT

Efeitos tóxicos de compostos de vanádio utilizados no tratamento do diabetes sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*)

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Profa. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim

Co-orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Recife – PE

2017

TIAGO DE QUEIROZ DA MOTA BITTENCOURT

Efeitos tóxicos de compostos de vanádio utilizados no tratamento do diabetes sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Aprovado em ____ de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Marleyne José Afonso Aciolly Lins Amorim

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (Presidente)

Prof. Dr. Athiê Jorge Guerra Santos

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Pesca e Aquicultura (1° Titular)

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (2° Titular)

Prof. Dr. Ademar Afonso de Amorim Júnior

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Anatomia (Suplente)

Dedicatória

À minha esposa, pelo constante apoio, força, amor e presença na minha vida.

À minha mãe, pelo apoio, amor e ensinamentos.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo.

Agradecimentos

A professora Marleyne José Afonso Aciolly Lins Amorim, pela oportunidade, confiança, dedicação, motivação e principalmente pelo amor de mãe a mim destinado, que resultaram neste trabalho.

Ao professor e amigo Pabyton Gonçalves Cadena, pois sem ele não seria possível meu ingresso no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA), e pelos seus constantes ensinamentos.

Aos meus familiares, pelo apoio e ajuda nesta jornada.

Aos membros do laboratório, pela ajuda, apoio e momentos de descontração, pois durante este período de convivência diário tornaram-se como uma segunda família.

A Amanda Rodrigues pela sua ajuda nos microscópios ópticos, passando dias avaliando cada embrião resultando no surgimento deste trabalho.

A Marília Cordeiro, pelo apoio, ensinamentos sobre os protocolos em geral e na manipulação correta dos animais presentes no laboratório. Além de sua contribuição na criação deste trabalho.

A Jadson Freitas, pelo companheirismo, ensinamentos sobre os protocolos em geral e na manipulação correta dos animais presentes no laboratório. Além de sua contribuição na criação deste trabalho.

A Thamiris Pinheiro, pelas suas contribuições na minha formação como um membro do LECA, me ensinando adequadamente cada protocolo. Obrigado!

Aos funcionários na UFRPE, pela ajuda nos momentos de necessidade.

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo coração, dedicar-se a ele.”

Buda

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Efeitos subletais observados em embriões de *Danio rerio* após exposição aos compostos de vanádio. A1 e A2: Embriões expostos por 24 hpf. B1 e B2: Embriões expostos por 48 hpf. C1 e C2: Embriões expostos por 72 hpf. D1 e D2: Embriões expostos por 96 hpf..... 33

Figura 2. *Danio rerio* expostos aos compostos de vanádio: (A e C) arcos branquiais apresentando congestão. (B e D) hemorragias na região opercular e nadadeira peitorais..... 33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Concentração letal ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos de vanádio para exposição aguda de embrio de *D. rerio* em 96 horas. CL50 ou CL90 (IC95%) – Concentração letal e intervalo de confiança em 95%. G.L. – Grau de liberdade. χ^2 – Qui-quadrado. N = 150 animais por teste..... 30
- Tabela 2. Efeitos teratogênicos avaliados em embriões de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de metavanadato de sódio, pentóxido de vanádio e sulfato de oxovanádio durante os períodos de 24, 48, 72 e 96 hpf. Siglas: Ep – Edema de pericárdio; Esv – Edema de saco vitelínico; Dc – Deformação na coluna; Dcau – Deformação na cauda; Coag – Coagulação; FC – Frequência Cardíaca; bpm/min – Batimentos por minuto/minuto..... 32
- Tabela 3. Etograma comportamental de *zebrafish* (*Danio rerio*)..... 34
- Tabela 4. Eventos comportamentais exibidos por *Danio rerio* adultos..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Coleção de modelos estatísticos no qual a variância amostral é particionada em diversos componentes devido a diferentes fatores (variáveis), que nas aplicações estão associados a um processo, produto ou serviço.

Bpm/minuto – Batimentos por minuto/minuto.

Células β – Células endócrinas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas. Responsáveis pela produção e excreção do hormônio insulina.

Coag. – Coagulação.

hpf – hora pós-fertilização.

Dc – Deformação na coluna.

Dcau – Deformação na cauda.

Ep. – Edema no pericárdio.

Esv. – Edema no saco vitelínico.

FC – Frequência cardíaca.

MV – Metavanadato de sódio.

PV – Pentóxido de vanádio.

SV – Sulfato de oxovanádio.

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico.

RESUMO

Foram avaliados os efeitos tóxicos do metavanadato de sódio (MV), pentóxido de vanádio (PV) e sulfato de oxovanádio (SV) em embriões e adultos de *zebrafish* (*D. rerio*). Os embriões foram expostos a concentrações de 10-1000 µg/mL para avaliação da CL₅₀ 96 h e seus efeitos teratogênicos. Os adultos foram expostos a 20 µg/mL para avaliar alterações comportamentais relacionadas à exposição dos compostos de vanádio e sobrevivência diária. Os embriões apresentaram uma CL₅₀ 96 h de 74,14 para o PV e 100% de mortalidade nas concentrações de 400-1000 µg/mL dos três compostos. Os efeitos teratogênicos mais significativos foram edemas de pericárdio e saco vitelínico ($p < 0,05$). Os adultos expostos aos compostos de vanádio apresentaram maior batimento opercular e escurecimento dos arcos branquiais. A exibição dos comportamentos Flutuar e Descansar nos adultos expostos foram significativos ($p < 0,05$), como também a exibição do comportamento Respiração aérea. Pode-se concluir que nos testes com os embriões o pentóxido de vanádio é o composto mais tóxico e que edemas de pericárdio e saco vitelínico foram os efeitos teratogênicos mais significativo e que a exposição dos adultos aos compostos de vanádio promoveram um aumento na frequência dos comportamentos inativos e de resposta ao estresse.

Palavras-chave: Vanádio, *Zebrafish*, Teste de toxicidade aguda e crônica, Efeitos teratogênicos, Comportamento animal

ABSTRACT

The toxic effects of sodium metavanadate (MV), vanadium pentoxide (PV) and oxovanadium sulfate (SV) on embryos and adults of *zebrafish* (*D. rerio*) were evaluated. Embryos were exposed to concentrations of 10-1000 µg/mL for evaluation of 96-h LC₅₀ and their teratogenic effects. Adults were exposed to 20 µg/mL to evaluate behavioral changes related to vanadium compounds exposure and daily survival. Embryos showed a 96-h LC₅₀ of 74.14 for PV and 100% mortality at the concentrations of 400-1000 µg/mL of the three compounds. The most significant teratogenic effects were pericardial edema and yolk sac ($p < 0.05$). The adults exposed to the vanadium compounds presented higher opercular beating and darkening of the gill arches. Floating and Resting behaviors in exposed adults were significant ($p < 0.05$), as well as the behavior of air breathing behavior. It can be concluded that in tests with the embryos the vanadium pentoxide is the most toxic compound and that pericardial edema and yolk sac were the most significant teratogenic effects and that the exposure of adults to vanadium compounds promoted an increase in the frequency of behaviors Inactive and stress response.

Keywords: Vanadium, *Zebrafish*, Acute and chronic toxicity test, Teratogenic effects, Animal behavior

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Diabetes	14
2.2. Vanádio	16
2.2.1. A ação do vanádio contra diabetes	17
2.3. Testes de toxicidade em peixes	18
2.4. <i>Danio rerio</i>	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
Capítulo 1	26
Efeitos tóxicos de compostos de vanádio utilizados no tratamento do diabetes sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	26
ANEXO 1	41
ANEXO 2	42

1. INTRODUÇÃO

A diabetes é uma síndrome do metabolismo causada pela ausência de secreção de insulina ou pela diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina. Há três tipos de diabetes, a tipo 1, causada geralmente por fatores hereditários, que acarreta na destruição das células β , responsáveis pela produção de insulina. A diabetes tipo 2, também denominada como diabetes adquirida, está associada a obesidade, a falta de exercícios físicos e uma alimentação rica em açúcares e gordura, acarretando em uma resistência dos tecidos à insulina e a diabetes gestacional, que ocorre geralmente a partir da 24ª semana de gravidez, a partir dos hormônios produzidos pela placenta (GUYTON, 2006).

As tipo 1 e 2, em longo prazo, causam complicações, pelo fato de modificarem estruturalmente os vasos sanguíneos (GUYTON, 2006). As mais comuns são retinopatias, nefropatias, neuropatias, nefropatias e ulcerações nos membros inferiores. Estas sequelas resultam em uma diminuição na qualidade de vida do indivíduo acometido, que o compromete economicamente, e um gasto extra nas políticas públicas de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

No fim dos anos 80, foi descoberta a importância do vanádio para o tratamento da diabetes, causando uma diminuição na glicose livre no sangue (HEYLIGER et al., 1985). O vanádio é um metal, de importância biológica, pois atua em várias funções metabólicas (POUCHERET et al., 1998). Por ser transicional, possui várias camadas de valência, tendo a possibilidade de formar compostos complexos (BADMAEV et al., 1999). Porém, devido a sua natureza metálica, a utilização deste metal em tratamentos com pacientes diabéticos, humanos ou não, acarreta em danos, principalmente de caráter gastrointestinal nos indivíduos (DOMINGOS; GÓMEZ, 2016).

Mesmo sendo indicado como fármaco para terapia alternativa, recentemente o vanádio foi estabelecido como poluente ambiental e tóxico aos seres humanos, provocando não apenas alterações fisiológicas, como anatômicas, inclusive em órgãos sexuais (GOSH et al., 2015). Os testes de toxicidade aguda em animais vertebrados são de extrema importância na avaliação do perigo que compostos químicos podem causar risco ao ambiente e a biota presente, principalmente a aquática (SCHOLZ et al., 2013). Por isto, a utilização de peixes nestes testes é bem difundida (BRAUNBECK et al., 2015).

O *Danio rerio*, comumente conhecido como *zebrafish*, foi implementado em 2013 como principal vertebrado em testes agudo e crônico para avaliação de toxicidade de compostos químicos(OECD, 2013).

As principais vantagens em utilizar o *zebrafish* adulto é seu tamanho diminuto, acarretando em uma diminuição na quantidade de compostos utilizados nos testes, que origina uma pequena quantidade de resíduos, além de sua fácil e barata manutenção (HILL et al., 2005). Já seus embriões, além do tamanho, têm um rápido desenvolvimento embrionário e seus ovos são transparentes (ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013), permitindo a visualização de efeitos subletais causados pela toxicidade aguda.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diabetes

A diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia causada por uma ineficiência na ação da insulina, na sua produção, ou em ambos. A fase crônica da hiperglicemia causa em longo prazo danos e disfunções a diversos órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Há três tipos de diabetes, a tipo 1, causada por uma reação do sistema autoimune, que acarreta na lesão das células β , que são responsáveis pela produção de insulina, infecções virais e distúrbios autoimunes podem estar relacionados à destruição destas células, porém a hereditariedade também desempenha um papel importante na degeneração celular, podendo até haver uma tendência hereditária. A diabetes tipo 2, está relacionada ao aumento da glicose plasmática, ocasionando em uma produção deficiente de insulina ou uma resistência do organismo à mesma, é causada por uma resposta compensatória das células β à diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvo aos efeitos metabólicos da insulina. Por fim há a diabetes gestacional, que ocorre geralmente na 24^o semana de gravidez e possivelmente é causada pelos hormônios produzidos na placenta (GUYTON, 2006; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Cerca de 90% dos casos de diabetes em adultos no mundo é causada pelo tipo 2, afetando, em geral, a população presente nos países ricos, porque está relacionada a um alto consumo de açúcar, uma dieta rica em gordura e

menor atividade física (SCULLY, 2012). Estas condições acarretam em uma redução da sensibilidade à insulina, prejudicando o armazenamento e utilização dos carboidratos. Esta resistência insulínica adquirida faz parte de uma cascata de distúrbios chamada de “síndrome metabólica” que tem como características a obesidade, com acúmulo de gordura abdominal, resistência à insulina, hiperglicemia de jejum, anormalidades lipídicas, como o aumento de triglicerídeos no sangue, e a hipertensão (GUYTON, 2006).

Cerca de 422 milhões de pessoas vivem com diabetes, e a prevalência mundial quase dobrou, em 1980 era de 4,7%, e em 2014 passou para 8,5%. Também causa um impacto econômico para o indivíduo, aos sistemas de saúde e economias nacionais através de um aumento significativo nos custos médicos, a perda de trabalhos e possível diminuição de salários. É uma das quatro principais doenças não-transmissíveis reconhecidas por causar incapacidade e morte prematura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Estima-se que o número de indivíduos acometidos pela diabetes atinja cerca de 600 milhões em 2035 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Aproximadamente 50% dos acometidos por algum tipo de diabetes sofrem das principais complicações relacionadas à doença, como cardiomiopatias, nefropatias, neuropatias, retinopatias e ulcerações nos membros inferiores (ISLAM et al., 2013). Há também um aumento da incidência para doenças vasculares, como a cerebrovascular e a arteriosclerose cardiovascular, e disfunção sexual (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Isto ocorre devido ao funcionamento anormal de vasos sanguíneos presentes nestes tecidos, pois a presença da glicose sanguínea causa alterações estruturais nos vasos, ocasionando em um aporte de sangue inadequado aos tecidos (GUYTON, 2006).

Em relação às cardiomiopatias, a diabetes aumenta o risco de doença cardíaca coronária em relação aos principais subtipos de AVC e mortes relacionadas a outras causas vasculares. Devido às lesões nas coronárias as chances de um infarto agudo do miocárdio aumentam em três vezes (THE EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION, 2010).

Cerca de 159 milhões de indivíduos com diabetes são acometidos por algum tipo de complicação visual, como a retinopatia diabética proliferativa ou não-proliferativa e o edema macular diabético (YAU et al., 2012).

No caso das neuropatias, estas possuem diversas manifestações clínicas, onde as mais comuns são as autônomas, podendo afetar o sistema gastrointestinal, cardiovascular e genitourinário, como também causar neuropatias periféricas sensitivo-motora (BOULTON et al., 2005).

Uma das principais neuropatias periféricas são as ulcerações nos membros inferiores, uma complicação multissistêmica que afeta a vascularização (PAPA et al., 2011) e acarreta em amputações, procedimentos realizados em cerca de 8.000 indivíduos nos países representados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (CARINCI et al., 2016).

2.2. Vanádio

Pertencente à família 5B da tabela periódica (MUKHERJEE et al., 2004), este metal foi descoberto em 1813 pelo mineralogista espanhol Del Rio, que o denominou panocrômio, devido a sua mudança de coloração de acordo com o estado de oxidação, só em 1831, o químico suíço Nils Gabriel o intitulou de vanadis.

O vanádio é um metal transicional, existindo em diferentes formas de valência (-3, -1, 0, +1 a +5), sendo estas formas altamente dependentes do pH (POUCHERET et al., 1998), e esta capacidade o torna importante biologicamente, pois possui a tendência de formar íons complexos (BADMAEV; PRAKASH; MAJEED, 1999).

Está presente no ar, através da combustão do petróleo e carvão, no solo surge na forma de metal traço e é considerado o 21º elemento mais abundante na crosta terrestre e apesar de encontrado em baixas concentrações nos alimentos (<1 V ng/g), esta é a principal fonte de obtenção para população geral (BARCELOUX, 1999).

Na forma de pentóxido de vanádio (V_2O_5) é absorvido através do sistema respiratório (GOC, 2006). Uma vez presentes no organismo, os compostos de vanádio podem penetrar nos eritrócitos através de difusão passiva, interagindo com a membrana a fim de estabilizar os complexos e realizar um processo de oxidação espontânea, com o objetivo transformá-los de íons catiônicos para íons aniônicos (YANG et al., 2003). Após isto, penetra nas células através dos canais aniônicos e é reduzido a forma de vanadil (VO^{2+}), após a redução interage com diversos oxidantes e redutores metabólicos, como por exemplo, o

catecol, NADPH, NADH e cisteína, com o objetivo de manter sua concentração (GOC, 2006).

A sua presença é importante nos organismos devido a sua ação em diversas funções, como o armazenamento e transporte de oxigênio, fazendo parte do complexo heme-férrico na hemoglobina, atuando na transferência de elétrons, no complexo heme-férrico dos citocromos, realizando catálises, transformando o cobalto em cobalamina e tendo papel na fotossíntese, atuando na formação de clorofila em conjunto com o magnésio (BADMAEV, PRAKASH, MAJEED, 1999).

2.2.1. A ação do vanádio contra diabetes

O efeito do vanádio foi diagnosticado em testes realizados com ratos induzidos à diabetes, através de estreptozotocina, onde os elevados níveis de concentração de glicose no plasma destes animais foram reduzidos (HEYLIGER et al., 1985; THOMPSON, 1999).

A terapia com este metal também atua de maneira positiva nos danos causados pela fase crônica da hiperglicemia, como as lesões teciduais, e restaurando a capacidade do fígado realizar ligações com a insulina nas primeiras duas semanas de administração oral (GOLDWASER et al., 2000).

A atuação do vanádio no organismo acometido por diabetes ainda é incerta, há indicações de que ele age como um auxiliar da insulina, exercendo aumento de afinidade aos receptores de insulina e de sensibilidade deste hormônio (FANTUS et al., 1990), como também há indícios que sua atuação é a nível de pós-recepção da insulina na célula (CAM et al., 2000).

Devido a sua eficiência no combate à diabetes, vários compostos de vanádio foram avaliados (TOTAN; GREABU, 2002; JACQUES-CAMARENA et al., 2008; SOVEID et al., 2013; PATHAK; LAHKAR, 2015; SHAH et al., 2016; TREVIÑO et al., 2016), com a finalidade de se encontrar um destes compostos que seja menos tóxico ao organismo, já que Domingo (2000) indica este fator como preocupante, pois por se tratar de um metal, ocorre acumulação destes em tecidos como testículos e baço. Também podem ocorrer danos a hepatócitos, epiteliais renais e epiteliais e da mucosa dos intestinos, bem como apoptose e interrupção do ciclo celular (IMURA et al., 2013; CUI et al., 2015).

Sua administração em longo prazo torna-se inviável, já que os testes em animais e pacientes humanos foram realizados durante curtos períodos e

apresentaram efeitos adversos, principalmente de caráter gastrointestinal (DOMINGOS; GÓMEZ, 2016).

2.3. Testes de toxicidade em peixes

Os testes de toxicidade aguda em vertebrados são importantes para a identificação de riscos ambientais, também como a avaliação de riscos de produtos químicos, fitofarmacêuticos, biocidas, fármacos, aditivos alimentares para animais e efluentes (SCHOLZ et al., 2013). Da mesma maneira, peixes são utilizados na avaliação da qualidade de efluentes e águas superficiais, tendo como consequência a aplicação destes como principais vertebrados nos testes de toxicidade aguda (BRAUNBECK et al., 2015). Em 2013, os testes de toxicidade aguda em embriões de peixe foram estabelecidos pela OECD como uma diretriz a fim de avaliar a toxicidade aguda e crônica de produtos químicos nos estágios embrionários, estabelecendo o *D. rerio* como modelo (OECD, 2013).

2.4. *Danio rerio*

São teleósteos de pequena proporção, cerca de 3 cm de comprimento, nativos da Índia e comumente utilizados na ornamentação de aquários. Os machos diferem das fêmeas por serem fusiformes e possuírem listras pretas longitudinais com uma coloração dourada no ventre e barbatanas. Sua utilização em laboratórios de pesquisa se iniciou no final dos anos 60, com o biólogo Streisinger, que o consolidou como modelo animal no início dos anos 80. Sua similaridade genética com seres humanos, sua fácil e barata manutenção, o rápido desenvolvimento dos embriões, sua fecundação externa e transparente, foram vitais para esta consolidação (WIXON, 2000; ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013).

O *zebrafish* demonstrou ser um modelo útil para o estudo de diversos sistemas complexos, como sistema óptico (SASZIK et al., 1999), o sistema olfatório (ARDOUIN et al., 2000), os rins (WINGERT; DAVIDSON, 2008), o ritmo circadiano (ZHAO et al., 2015), a proliferação de cardiomiócitos (MATRONE et al., 2016) e o sistema dopaminérgico (NADERI et al., 2016), bem como estudo com antidepressivos (PITTMAN, HYLTON, 2015).

O *D. rerio*, devido a sua similaridade genética, também é implementado como modelo animal para o estudo de diversas doenças que acometem os humanos, como os carcinomas, leucemia (SQUIBAN; FRAZER, 2014),

hepatocarcinoma (LU et al., 2015), mieloma (LIN et al., 2016), e as de origem genética, como a doença de Batten (WAGER et al., 2016), e a miopatia miofibrilar (BÜHRDEL et al., 2015)

São utilizados amplamente em testes de toxicidade aguda, pois apresentam uma série de vantagens como tamanho, criação e morfologia precoce. Além disto, em contraste com as espécies de maior porte, suas pequenas dimensões, tanto na fase embrionária quanto na adulta, permitem o uso de uma quantidade menor de doses de soluções, como produtos químicos experimentais, drogas e poluentes, resultando na criação de um volume limitado de resíduos que serão eliminados após as avaliações, além de uma quantidade menor de fixadores e inclusão, no caso de análises histológicas (HILL et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito tóxico de três compostos de vanádio de uso comercial nos parâmetros biológicos de embriões e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a CL₅₀ 96h da exposição de metavanadato de sódio, pentóxido de vanádio e sulfato de oxovanádio em embriões de *D. rerio*.
- Indicar os principais efeitos subletais, efeitos teratogênicos e frequência cardíaca, causados pela exposição aos compostos de vanádio em embriões de *D. rerio*.
- Submeter adultos de *D. rerio* a concentrações, baseada na CL₅₀ 96 h, dos compostos de vanádio para avaliação comportamental e sobrevivência diária.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 33(1), pp 562-569, 2010.

ARDOUIN, O. et al. Characterization of the two zebrafish orthologues of the *KAL-1* gene underlying X chromosome-linked Kallman syndrome. **Mechanics of Development**, 90, pp 89-94, 2000.

BADMAEV, V et al. Vanadium: A review of its potential role in the fight against diabetes. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 5(3), pp 273-291, 1999.

BARCELOUX, D. G. Vanadium. **Clinical Toxicology**, 37(2), pp 265-278, 1999.

BOULTON, A. J. M. et al. Diabetic Neuropathies. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, pp 956-962, 2005.

BRAUNBECK, T. et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, 22, 16247-16261, 2015.

BÜHRDEL, J. B. et al. *In vivo* characterization of human myofibrillar myopathy genes in zebrafish. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 461, pp 217-223, 2017.

CAM, M. et al. Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin enhancing agent? **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 78, 829-847, 2000.

CARINCI, F. et al. Lower extremity amputation rates in people with diabetes as an indicator of health systems performance. A critical appraisal of the data collection 2000-2011 by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). **Acta Diabetologica**, 2016.

CUI, W.; GUO, H.; CUI, H. Vanadium toxicity in the thymic development. **Oncotarget**, v. 6(30), pp 28661-28677, 2015.

DOMINGO, J. L. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? **Molecular and Cellular Biochemistry**, 203, pp 185-187, 2000.

DOMINGO, J. L.; GÓMEZ, M. Vanadium compounds for the treatment of human diabetes mellitus: A scientific curiosity? A review of thirty years of research. **Food and Chemical Toxicology**, 95, pp 137-141, 2016.

FANTUS, I. G. et al. Vanadate augments insulin binding and prolongs insulin action in rat adipocytes. **Endocrinology**, v. 127, p. 2716-2725, 1990.

GOC, A. Biological activity of vanadium compounds. **Central European Journal of Biology**, v. 1 (3), p. 314-332, 2006.

GOLDWWASER, I. et al. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 80, p. 21-25, 2000.

GOSH, S. K. et al. Toxicity of inorganic vanadium compounds. **Research on Chemical Intermediates**, 41, pp 4873-4897, 2015.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. Arthur C. Guyton, John E. Hall. 11th ed. Tradução de Barbara de Alencar Martins et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Pp 972-974.

HEYLIGER, C. E. et al. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. **Science**, v. 227, p. 1474-1477, 1985.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, 86(1), pp 6-19, 2005.

IMURA, H. et al. Vanadium toxicity in mice: Possible impairment of lipid metabolism and mucosal epithelial cell necrosis in the small intestine. **Toxicologic Pathology**, 41, pp 842-856, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – IDF. **IDF Diabetes Atlas**. 6th edition, 2013. Disponível em: <www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em 20/05/2016.

ISLAM, S. et al. Animal models of diabetes and its associated complications. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1. 2013.

JACQUES-CAMARENA, O. et al. Effect of vanadium on insulin sensitivity in patients with impaired glucose tolerance. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 53, p. 195-198, 2008.

LIN, J. et al. A clinically relevant in vivo zebrafish model of human multiple myeloma to study preclinical therapeutic efficacy. **Blood**, v. 128(2), pp 249-252, 2016.

LU, J. W. et al. Zebrafish as a disease model for studying human hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21(42), pp 12042-12058, 2015.

MATRONE, G. et al. Cardiomyocyte proliferation in zebrafish and mammals: lessons for human disease. **Cellular and Molecular Life Science**, 2016.

MUKHERJEE, B. et al. Vanadium – an element of atypical biological significance. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 135-143, 2004.

NADERI, M. et al. Modulatory effects of dopamine receptors on associative learning performance in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 303, pp 109-119, 2016.

OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test**. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 2013.

PAPA, G. et al. Differenze nella prevalenza di complicanze micro- e macroangiopatiche in diabetici con ulcere neuropatiche o neuroischemiche. **Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo**, 31, pp 5-9, 2011.

PITTMAN, J.; HYLTON, A. Behavioral, endocrine, and neuronal alterations in zebrafish (*Danio rerio*) following sub-chronic coadministration of fluoxetine and ketamine. **Pharmacological Biochemistry and Behavior**, 139, pp 158-162, 2015.

POUCHERET, P. et al. Vanadium and diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 188, pp 73-80, 1998.

SASZIK, S. et al. ERG assessment of zebrafish retinal development. **Visual Neuroscience**, 16, 881-888, 1999.

SCHOLZ, S. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 67, pp 506-530, 2013.

SCULLY, T. Diabetes in numbers. **Nature**, v. 485, p. s2-s3, c 2012.

SHAH, S. Z. H. et al. Effects of oral vanadium on glycaemic and lipid profile in rats. **Journal of the Pakistan Medical Association**, 66(12), pp 1592-1596, 2016.

SOVEID M. et al. Long- term efficacy and safety of vanadium in the treatment of type 1 diabetes. **Archives of Iranian Medicine**, 16(7), pp 408-411, 2013.

SQUIBAN, B.; FRAZER, J. K. *Danio rerio*: Small fish making a big splash in leukemia. **Current Pathobiology Reports**, 2, pp 61-73, 2014

THE EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **The Lancet**, v. 375, pp 2215-2222, 2010.

THOMPSON, K. H. Vanadium and diabetes. **BioFactors**, v. 10, p. 43-51, 1999.

TOTAN, A. R.; GREABU, M. Effect of chronic hiperglycemia and vanadate treatment on erythrocyte Na/K-ATpase and Mg-Atpase in streptozotocin diabetic rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 59(4), pp 307-311, 2002.

TREVIÑO, S. et al. Metforminium decanavadate as a potencial metallopharmarceutical drug for treatment of diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 14 pp, 2016.

WAGER, K. et al. Neurodegeneration and epilepsy in a zebrafish model of CLN3 disease (Batten Disease). **Public Library of Science ONE**, 11(6): e0157365.

WINGERT, R. A.; DAVIDSON, A. J. The zebrafish pronephros: A model to study nephron segmentation. **Kidney International**, 73, pp 1120-1127, 2008.

WIXON, J. *Danio rerio*, the zebrafish. **Yeast**, 17, pp 225-231, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Report on Diabetes**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>>. Acesso em: 25/08/2016.

YAU, J. W. Y. et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care**, v. 35, p. 556-564, 2012.

ZHAO, Y. et al. Environmental progestins progesterone and drospirenone alter the circadian rhythm network in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, 49, 10155-10164, 2015.

ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. **Pesquisa Fapesp**, Ed. 209, pp 16-21, 2013.

Capítulo 1

Artigo que será submetido a Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia (Qualis A2)

Efeitos tóxicos de compostos de vanádio utilizados no tratamento do diabetes sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*)

[Toxic effects of vanadium compounds used to treat diabetes on biological parameters of embryos and adults of *zebrafish* (*Danio rerio*)]

Resumo

Foram avaliados os efeitos tóxicos do metavanadato de sódio (MV), pentóxido de vanádio (PV) e sulfato de oxovanádio (SV) em embriões e adultos de *zebrafish* (*D. rerio*). Os embriões foram expostos a concentrações de 10-1000 µg/mL para avaliação da CL₅₀ 96 h e seus efeitos teratogênicos. Os adultos foram expostos a 20 e 10 µg/mL para avaliar alterações comportamentais relacionadas à exposição dos compostos de vanádio e sobrevivência diária. Os embriões apresentaram uma CL₅₀ 96 h de 74,14 para o PV e 100% de mortalidade nas concentrações de 400-1000 µg/mL dos três compostos. Os efeitos teratogênicos mais significativos foram edemas de pericárdio e saco vitelínico ($p < 0,05$). Adultos expostos aos compostos de vanádio apresentaram maior batimento opercular e congestão nos arcos branquiais. A exibição dos comportamentos Flutuar e Descansar nos adultos expostos foram significativos ($p < 0,05$), como também a exibição do comportamento Respiração aérea. Pode-se concluir que nos testes com os embriões o pentóxido de vanádio é o composto mais tóxico e que edemas de pericárdio e saco vitelínico foram os efeitos teratogênicos mais significativo e que a exposição dos adultos aos compostos de vanádio promoveu um aumento na frequência dos comportamentos inativos e de resposta ao estresse.

Palavras-chave: Vanádio, *Zebrafish*, Teste de toxicidade aguda e crônica, Efeitos teratogênicos, Comportamento animal

Abstract

The toxic effects of sodium metavanadate (MV), vanadium pentoxide (PV) and oxovanadium sulfate (SV) on embryos and adults of *zebrafish* (*D. rerio*) were evaluated. Embryos were exposed to concentrations of 10-1000 µg/mL for evaluation of 96-h LC₅₀ and their teratogenic effects. Adults were exposed to 20 and 10 µg/mL to

35 evaluate behavioral changes related to vanadium compounds exposure and daily
36 survival. Embryos showed a 96-h LC₅₀ of 74.14 for PV and 100% mortality at the
37 concentrations of 400-1000 µg/mL of the three compounds. The most significant
38 teratogenic effects were pericardial edema and yolk sac ($p < 0.05$). Adults exposed to
39 the vanadium compounds presented higher opercular beating and congestion in the gill
40 arches. Floating and Resting behaviors in exposed adults were significant ($p < 0.05$), as
41 well as the behavior of air breathing behavior. It can be concluded that in tests with the
42 embryos the vanadium pentoxide is the most toxic compound and that pericardial edema
43 and yolk sac were the most significant teratogenic effects and that the exposure of adults
44 to vanadium compounds promoted an increase in the frequency of behaviors Inactive
45 and stress response.

46 *Keywords:* Vanadium, *Zebrafish*, Acute and chronic toxicity test, Teratogenic effects,
47 Animal behavior

48 **1. Introdução**

49 A diabetes é uma importante doença endócrina que afeta tanto seres humanos
50 como animais domésticos incluindo cães e gatos. A obesidade é um dos principais
51 fatores para a diabetes mellitus em animais, pois a acumulação de tecido adiposo traz
52 uma série de adversidades metabólicas, como alterações no metabolismo de lipídios e
53 carboidratos, bem como na regulação energética (Clark e Hoening, 2016). Além das
54 dietas comerciais, oferecidas em abundância a estes animais, as faltas de exercícios,
55 pelo confinamento em suas residências, contribuem para o surgimento da diabetes
56 (Öhlund et al., 2017). Complicações clínicas oriundas da diabetes causam alterações em
57 diferentes órgãos, podendo induzir complicações, como as neuropatias, as nefropatias e
58 as retinopatias (Neumann et al., 2017).

59 Dentre os fármacos usados para o tratamento da diabetes em humanos, o vanádio
60 é um importante metal traço, amplamente distribuído na natureza (Imtiaz et al., 2015),
61 que tem recebido uma atenção especial da área farmacológica devido a sua ação como
62 agente terapêutico alternativo, diminuindo eficazmente os níveis de glicose sanguínea
63 em pacientes diabéticos (Goc, 2006). Porém, testes com pacientes, humanos ou não
64 (ratos), demonstraram problemas de caráter gastrointestinal, mesmo durante curtos
65 períodos de administração (Domingo e Gómez, 2016). O vanádio mesmo sendo
66 utilizado como fármaco, recentemente foi estabelecido como poluente ambiental e
67 tóxico aos seres humanos, provocando não apenas alterações fisiológicas, como
68 anatômicas, inclusive em órgãos sexuais (Ghosh et al., 2015). Porém estes efeitos não

69 são bem conhecidos em animais. Diante disto, os testes de toxicidade são de
70 importância para a avaliação dos efeitos causados por produtos químicos (Scholz et al.,
71 2013), onde os peixes são os principais vertebrados utilizados na avaliação de
72 toxicidade (Braunbeck et al., 2015) sendo o *zebrafish* (*Danio rerio*) estabelecido em
73 2013 pela OECD, como modelo para avaliação de testes agudos e crônicos de
74 toxicidade causados por produtos químicos (OECD, 2013). Diante do exposto, o
75 objetivo deste trabalho foi avaliar a LC₅₀ 96 h, os efeitos subletais e crônicos de três
76 compostos de vanádio em relação aos efeitos teratogênicos e cardiovasculares de
77 embriões e alterações comportamentais de adultos de *D. rerio*.

78 **2. Material e métodos**

79 Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia Animal –
80 ECA da UFRPE. Biotério de experimentação cadastrado na plataforma CIUCA-
81 CONCEA. Todas as metodologias utilizadas no projeto foram previamente aprovadas
82 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRPE), licença 028/2016. Os
83 compostos de vanádio utilizados foram o metavanadato de sódio (NaVO₃) (Lote #
84 MKCB0474V), o pentóxido de vanádio (V₂O₅) (Lote # MKBZ4641V) e o sulfato de
85 oxovanádio (O₅SV) (Lote # MKBV2295V) (SIGMA – EUA). Os outros reagentes
86 utilizados foram de grau analítico.

87 Os testes de toxicidade aguda dos compostos de vanádio em embriões de *D.*
88 *rerio* seguiu as recomendações da (OECD 236). Os embriões de *D. rerio* foram obtidos
89 através da utilização do protocolo de Westerfield (2000), utilizando machos e fêmeas na
90 proporção de 2:1 em aquários de reprodução, com fotoperíodo de 14/10 horas de claro e
91 escuro, respectivamente. Após a desova, os ovos foram recolhidos e observados através
92 de microscópio óptico de luz (com lâmpada LED) 1 hpf. Os que demonstraram
93 desenvolvimento da blástula foram acondicionados em reservatórios estéreis de
94 poliestireno de 80 mL (n=10), com pH 7,0 ± 0,5 e temperatura ambiente de 26 ± 1°C, os
95 que não apresentaram desenvolvimento ou lesões no córion foram descartados. Os
96 embriões foram expostos às diferentes concentrações dos três compostos, metavanadato
97 de sódio (MV), pentóxido de vanádio (PV) e sulfato de oxovanádio (SV), além do
98 grupo controle (em triplicatas autênticas) em teste de toxicidade aguda de acordo com
99 Ghosh et al. (2015). As concentrações utilizadas foram 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e
100 1000 µg/mL. Os efeitos teratogênicos observados foram: edema de pericárdio, edema
101 do saco vitelínico, deformação na coluna, deformação na cauda e coagulação (Jonas et
102 al., 2015), frequência cardíaca (Yang, 2016) e mortalidade avaliados nos intervalos de

103 24, 48, 72 e 96 hpf. Para a determinação da CL₅₀ 96 h, foi utilizado o método de
104 PROBIT com qui-quadrado, utilizando o Software Biostat Pro 5.9.9.2.

105 As concentrações dos compostos de vanádio para os ensaios com os adultos
106 foram indicadas após avaliação da CL₅₀ 96h dos embriões, resultando em valores de 20
107 e 10 µg/mL correspondente a 100% e 50% CL₅₀ 96h do composto mais tóxico,
108 respectivamente. Os adultos de *D. rerio* foram obtidos comercialmente, aclimatados por
109 cinco dias em aquários de 20 litros aerados, com temperatura ambiente de 26 ± 1°C e
110 fotoperíodo natural. A água utilizada foi tratada com tiosulfato de sódio para redução
111 do cloro e com hidróxido de sódio para ajuste do pH (7,0 ± 0,5). Durante o período de
112 aclimatação, os animais foram alimentados com ração extrusada (45% de proteína
113 bruta) uma vez ao dia. Após o período de aclimatação os animais foram divididos em 7
114 grupos (n=10) em aquários (8 litros), onde foram submetidos aos três compostos de
115 vanádio diluídos na água nas concentrações de 20 e 10 µg/mL, além do grupo controle.
116 Foi construído um etograma para *D. rerio* pelo método *ad libitum* (Altmann, 1974)
117 baseado nas informações comportamentais fornecidas por Kalueff et al. (2013) para as
118 avaliações comportamentais. O comportamento dos animais expostos aos compostos de
119 vanádio foi avaliado pelo método de varredura instantânea (Altmann, 1974) em um
120 ponto fixo, para não influenciar no comportamento dos animais. Foi determinado um
121 minuto de observação seguido com um minuto de intervalo por 30 min para cada
122 aquário durante as observações. Adicionalmente, foi observado a sobrevivência diária
123 dos animais, os que foram a óbito tiveram a região opercular dissecada para a
124 averiguação da *causa mortis*.

125 Os efeitos teratogênicos dos embriões e os comportamentos dos adultos foram
126 estatisticamente averiguados através da análise de variância unidirecional (ANOVA)
127 seguido pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando p
128 < 0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Origin Pro Academic 2015
129 (Origin Lab. Northampton, MA USA).

130 **3. Resultados**

131 Os resultados da CL₅₀ 96 h em embriões de *Danio rerio* expostos aos três
132 compostos de vanádio seguindo a norma da OCDE 236 (2013) são mostrados na Tab. 1.
133 Observa-se que PV apresentou a menor CL₅₀ 96 h indicando que o mesmo possui maior
134 toxicidade. Já o MV apresentou a maior CL₅₀ 96 h indicando que o mesmo foi o menos
135 tóxico.

136 Tabela 1. Concentração letal ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos compostos de vanádio para exposição aguda de embrio de *D.*
 137 *rerio* em 96 horas. CL₅₀ ou CL₉₀ (IC_{95%}) – Concentração letal e intervalo de confiança em 95%. G.L. –
 138 Grau de liberdade. χ^2 – Qui-quadrado. N = 150 animais por teste.

CL ₅₀ (Metavanadato de sódio -MV)			
96 Horas			
CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	G.L.	χ^2
74,14 _(38,02 – 110,25)	200,85	3	4,197
CL ₅₀ (Pentóxido de vanádio - PV)			
96 Horas			
CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	G.L.	χ^2
22,48 _(-11,37 – 56,33)	168,97	3	0,21
CL ₅₀ (Sulfato de oxovanádio - SV)			
96 Horas			
CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	G.L.	χ^2
53,62 _(-1,14 – 108,38)	186,53	3	2,82

139 Após 96 h de exposição aos compostos de vanádio foi observado 100% de
 140 mortalidade nos animais expostos as concentrações de 1000, 800, 600 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 141 (Tab. 2). Em concentrações abaixo de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi observado maior sobrevivência
 142 dos animais e conseqüentemente os efeitos subletais.

143 A Tab. 2 apresenta os efeitos teratogênicos para cada concentração (0 – 200
 144 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos compostos de vanádio em razão da hpf. Em 24 hpf, foi observado o edema
 145 de pericárdio (Ep.) ($p < 0,05$) em todos os animais expostos aos compostos de vanádio,
 146 exceto aos animais expostos ao MV em 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p > 0,05$) e ao PV em 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 147 ($p > 0,05$). O edema no saco vitelínico (Esv.) foi observado ($p < 0,05$) em todos os
 148 animais expostos às concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MV, de 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PV
 149 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SV. Estes resultados indicam que os compostos de vanádio podem
 150 causar alterações cardiovasculares, mas este efeito não é dependente da dose. Já em
 151 relação a frequência cardíaca, foi observado alterações significativas ($p < 0,05$) em
 152 todos os animais expostos às concentrações de MV e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PV, novamente sem
 153 relação direta com a dose utilizada.

154 Em 48 hpf, o edema de pericárdio foi observado ($p < 0,05$) em todos os animais
 155 expostos aos compostos de vanádio, exceto nos animais expostos às menores
 156 concentrações de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PV e SV. O edema de saco vitelínico foi observado ($p <$
 157 $0,05$) em todos os animais expostos às concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MV, de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 158 de PV e em todas as concentrações de SV. Assim como em 24 hpf, estes efeitos não
 159 foram dependentes da dose e a frequência com que ocorriam nos animais foi
 160 semelhante. Foram observados ($p < 0,05$) alterações na frequência cardíaca em todos os

161 animais expostos as maiores concentrações dos compostos de vanádio (Tab. 2) sem
162 relação direta com a dose utilizada.

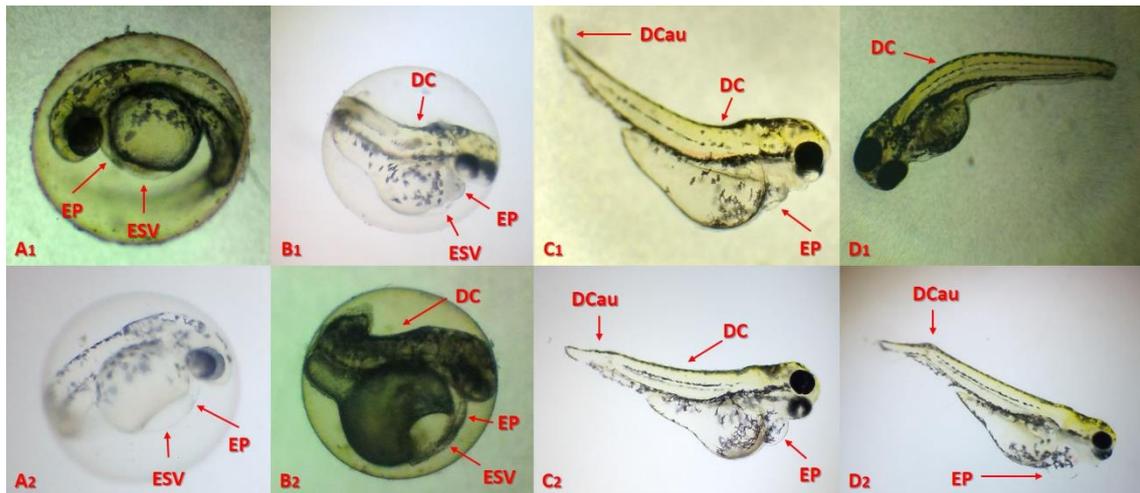
163 Em 72 hpf, o edema de pericárdio foi observado ($p < 0,05$) nos animais expostos
164 às concentrações 10 - 100 $\mu\text{g/mL}$ de MV, de 10 $\mu\text{g/mL}$ de PVe 50 $\mu\text{g/mL}$ SV sem
165 relação com a dose utilizada. Já o edema de saco vitelínico não foi observado ($p > 0,05$)
166 nos animais expostos aos compostos de vanádio. Diante disto, observa-se que com o
167 desenvolvimento dos animais houve uma redução na frequência de aparecimento dos
168 edemas. Apenas após 72 hpf foram observadas deformações relacionadas a cauda e a
169 coluna. O efeito deformação na coluna (Dc.) foi observado ($p < 0,05$) apenas nos
170 animais expostos a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de MV. Já em relação ao efeito
171 deformação na cauda (Dcau.), foi observado ($p < 0,05$) nos animais expostos ao MV na
172 concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Foram observadas alterações na frequência cardíaca sem
173 relação com a dose nos animais expostos ao MV. Já em relação ao PV e SV, foi
174 observado uma redução da frequência cardíaca com o aumento da concentração do
175 composto ($p < 0,05$). Sendo este efeito mais evidente no SV (Tab. 2).

176 Em 96 hpf, o edema do pericárdio (Ep.) foi observado ($p < 0,05$) nos animais
177 expostos à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de PV. Este resultado indica, como mencionado
178 acima, uma redução no aparecimento de edemas com o desenvolvimento do animal. Já
179 em relação à deformação na cauda (Dcau.), foi observado ($p < 0,05$) apenas nos animais
180 expostos à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de MV. Já em relação a frequência cardíaca, o
181 efeito de redução da mesma dependente da dose observado em 72 hpf não foi mais
182 observado.

183 Adicionalmente, a Fig. 1 apresenta os efeitos subletais que ocorreram nos
184 embriões de *D. rerio* submetidos às diferentes concentrações dos três compostos de
185 vanádio em 24, 48, 72 e 96 hpf.

186 Tabela 2. Efeitos teratogênicos avaliados em embriões de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de metavanadato de sódio, pentóxido de vanádio e sulfato de
 187 oxovanádio durante os períodos de 24, 48, 72 e 96 hpf. O sombreado enfatiza os efeitos significativos. Siglas: Ep – Edema de pericárdio; Esv – Edema de saco vitelínico;
 188 Dc – Deformação na coluna; Dcau – Deformação na cauda; Coag – Coagulação; FC – Frequência Cardíaca; bpm/min – Batimentos por minuto/minuto.

Tempo	Composto Concentrações (µg/mL)	Controle 0	Metavanadato de sódio (MV)				Pentóxido de vanádio (PV)			Sulfato de oxovanádio (SV)	
			10	50	100	200	10	50	100	10	50
24 h	Efeito (%)										
	Mortalidade (%)	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0
	Ep. (%)	0	6,3 ± 2,3*	2,3 ± 0,6*	4,3 ± 0,6*	1,3 ± 1,5	4,7 ± 1,2*	2,7 ± 0,6*	2,3 ± 1,5	4,7 ± 0,6*	5,3 ± 2,5*
	Esv. (%)	0	0	3,7 ± 2,1*	3,3 ± 1,5*	2,3 ± 1,5	3,0 ± 1,0*	2,7 ± 1,5*	4,3 ± 0,6*	4,7 ± 3,1	3,3 ± 1,2*
	Dc. (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcau. (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Coag. (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	131,4 ± 23,2	120,7 ± 12,5*	153,2 ± 20,6*	155,1 ± 14,4*	118,9 ± 17,0*	130,3 ± 15,0	169,1 ± 14,7*	131,6 ± 12,4	128,5 ± 20,6	128,5 ± 20,6
48 h	Mortalidade (%)	0	0	0	0	53,3	0	3,3	0	0	3,3
	Ep. (%)	0	5,3 ± 0,6*	4,0 ± 1,7*	4,7 ± 0,6*	2,0 ± 2,6	3,3 ± 2,3	3,7 ± 2,1*	6,3 ± 2,5*	2,7 ± 1,5	6,3 ± 1,2*
	Esv. (%)	0	1,7 ± 1,5	1,3 ± 0,6*	0,3 ± 0,6	0,3 ± 0,6	3,0 ± 1,7*	1,3 ± 1,5	0,3 ± 0,6	5,0 ± 1,0*	2,3 ± 1,2*
	Dc. (%)	0	0	0,3 ± 0,6	0,3 ± 0,6	0	0	0	1 ± 1,7	0	0,7 ± 0,6
	Dcau. (%)	0	0	0,3 ± 0,6	0	0	0	0	0	0	0,3 ± 0,6
	Coag. (%)	0	0	0,3 ± 0,6	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	172,7 ± 20,1	179,2 ± 16,0	190,1 ± 8,5*	190,9 ± 13,3*	141,1 ± 13,1*	176,1 ± 21,0	188,6 ± 11,2*	163,3 ± 7,6*	164,3 ± 10,9	179,9 ± 15,3
	72 h	Mortalidade (%)	3,33	0	6,7	46,7	93,3	0	13,3	10	0
Ep. (%)		0	3,0 ± 1,7*	4,7 ± 1,5*	2,3 ± 1,2*	0	2,0 ± 0,0*	1,3 ± 2,3	2,0 ± 2,6	2,7 ± 2,5	4,7 ± 1,2*
Esv. (%)		0	0	0,3 ± 0,6	0	0	0,3 ± 0,6	0	0	0,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2
Dc. (%)		0	2,3 ± 2,1	2,3 ± 0,6*	0,3 ± 0,6	0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 1,2	0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 1,2
Dcau. (%)		0	1,0 ± 0,0*	1,0 ± 1,0	0,3 ± 0,6	0	0	0,3 ± 0,6	0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6
Coag. (%)		0	0	0	0	0	0	0	0	0,3 ± 0,6	0
FC (bpm/min)		194,3 ± 12,8	185,0 ± 14,2*	199,1 ± 13,9	172,5 ± 23,3*	172,0 ± 17,0*	190,0 ± 24,0	197,8 ± 15,9	173,6 ± 17,5*	185,1 ± 13,9*	177,5 ± 16,3*
96 h		Mortalidade (%)	0	6,7	33,4	90	96,6	6	70	90	6,7
	Ep. (%)	0	2,0 ± 2,0	1,7 ± 1,5	0,7 ± 1,2	0	2,0 ± 0,0*	0	0	3,7 ± 2,5	1,0 ± 1,0
	Esv. (%)	0	0	0	0	0	0,3 ± 0,6	0	0	0	0
	Dc. (%)	0	0,7 ± 0,6	1,3 ± 2,3	0,3 ± 0,6	0	0,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2	0	0	0,3 ± 0,6
	Dcau. (%)	0	2,3 ± 0,6*	0,7 ± 1,2	0	0	0	0,3 ± 0,6	0	0,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2
	Coag. (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	204,5 ± 20,4	187,9 ± 26,8*	203,4 ± 31,6	186,7 ± 12,9	212,0 ± 0,0	193,8 ± 7,8	172,9 ± 26,9*	214,7 ± 23,4	201,4 ± 9,5	177,1 ± 17,1 *

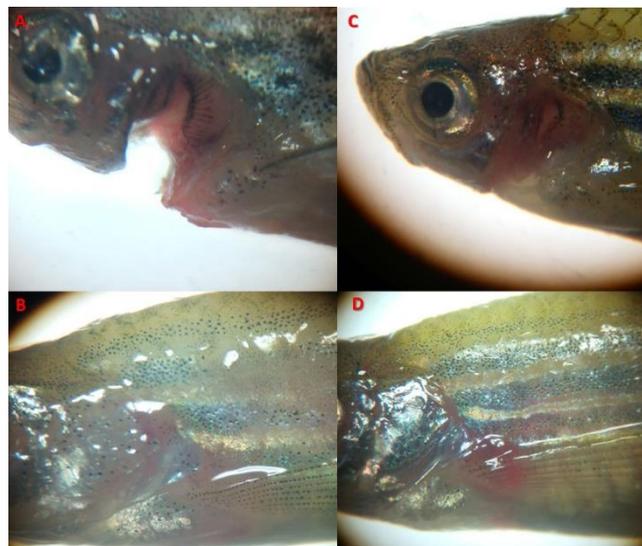


189

190 Figura 1. Efeitos subletais observados em embriões de *Danio rerio* após exposição aos compostos de
 191 vanádio. A1 e A2: Embriões expostos por 24 hpf. B1 e B2: Embriões expostos por 48 hpf. C1 e C2:
 192 Embriões expostos por 72 hpf. D1 e D2: Embriões expostos por 96 hpf.

193

194 Durante o período de exposição aos três compostos de vanádio nos adultos
 195 submetidos a teste de toxicidade crônica foi possível observar um aumento qualitativo
 196 do batimento opercular e natação próximo à linha d'água. Os peixes expostos ao MV e
 197 PV também apresentaram hemorragias nas regiões do opérculo e nas nadadeiras
 198 peitorais e após dissecação da região opercular foi possível observar os arcos branquiais
 199 com congestão (Fig. 2).



200

201 Figura 2. *Danio rerio* expostos aos compostos de vanádio: (A e C) arcos branquiais apresentando
 202 congestão, (B e D) hemorragias na região opercular e nadadeiras peitorais.

203

204 Para os estudos comportamentais, dentre os dados obtidos a partir do método *ad*
 205 *libitum* (Altmann, 1974) para a elaboração do etograma, foram observados 10

206 comportamentos extraídos de Kalueff et al. (2013): Nadar lento, Nadar rápido, Flutuar,
 207 Descansar, Natação inclinada, Capturar, Forragear, Afugentar, Fuga e Respiração aérea,
 208 agrupados nas Categorias: *Locomoção, Alimentação, Social e Resposta ao Estresse* que
 209 podem ser observados na Tab. 3.

210

211 Tabela 3. Etograma comportamental de *zebrafish* (*Danio rerio*).

<i>Evento</i>	<i>Sigla</i>	<i>Descrição</i>
<i>Categoria Locomoção</i>		
Nadar lento	<i>NL</i>	O animal movimenta sua nadadeira caudal lentamente de modo que seu deslocamento ocorra normalmente.
Nadar rápido	<i>NR</i>	O animal movimenta sua nadadeira caudal rapidamente de modo que se desloque rapidamente no corpo d'água. Este comportamento pode ser seguido por qualquer ataque.
Flutuar	<i>FL</i>	O animal mantém-se sem movimento, no corpo d'água, com as nadadeiras laterais fechadas.
Descansar	<i>DE</i>	Os animais mantêm-se sem movimento, no substrato, com as nadadeiras laterais fechadas.
Natação inclinada	<i>NI</i>	Natação em um ângulo diferente de 90° em relação à superfície d'água
<i>Categoria Alimentação</i>		
Capturar	<i>CA</i>	O animal nada em direção ao alimento e faz um movimento rápido com a boca.
Forragear	<i>FO</i>	O animal nada próximo ao substrato à procura de alimento.
<i>Categoria Social</i>		
Afugentar	<i>AG</i>	O animal nada em direção ao oponente, podendo ou não haver contato, causando ou não fuga do outro.
Fuga	<i>FU</i>	O animal se afasta do oponente que o afugenta ou ataca.
<i>Categoria Resposta ao Estresse</i>		
Respiração aérea	<i>RA</i>	O animal utiliza respiração aérea, mesmo sob condições de aeração

212

213 Com a construção do etograma, foi possível a realização das observações
 214 comportamentais dos animais expostos aos compostos de vanádio. A Tab. 4 apresenta
 215 os comportamentos mais significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle. Na Categoria
 216 Locomoção foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) do
 217 comportamento Nadar lento nos animais expostos exceto no composto MV (20 $\mu\text{g/L}$).
 218 No comportamento Nadar rápido também há uma redução significativa ($p < 0,05$) para
 219 todos os compostos, exceto no composto SV (20 $\mu\text{g/L}$). Foi observado também no
 220 comportamento Natação inclinada uma redução significativa ($p < 0,05$) na frequência de
 221 exibição deste comportamento diante das seis concentrações de composto de vanádio.
 222 Após a análise dos resultados, observa-se uma redução da exibição de comportamentos
 223 ativos por parte dos animais expostos o que pode estar relacionado a intoxicação com os
 224 compostos de vanádio.

225 Já em relação ao comportamento Flutuar, foi observado um aumento significativo
 226 ($p < 0,05$) na frequência de exibição dos animais expostos, exceto no MV (20 $\mu\text{g/L}$) e

no PV (10 µg/L). Para o comportamento Descansar também foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de exibição dos animais expostos ao MV (20 µg/L), PV (20 µg/L) e PV (10 µg/L). Isto indica um aumento da exibição de comportamentos inativos principalmente nos animais expostos a PV e também pode estar relacionado com uma possível intoxicação.

Ainda na Tab, 4, na Categoria Alimentação, os animais expostos aos três compostos de vanádio apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no comportamento Forragear em relação ao controle. Isto indica uma redução na procura por alimento. Já para a Categoria Social, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) na frequência de exibição dos comportamentos Perseguir e Fuga dos animais expostos aos compostos de vanádio. Os comportamentos das categorias Alimentação e Social também são comportamentos ativos onde foi observado uma redução na exibição da frequência destes comportamentos da mesma forma que ocorreu com os comportamentos ativos da categoria Locomoção.

Para a Categoria Resposta ao Estresse, foi observado um aumento ($p < 0,05$) da frequência de exibição do comportamento Respiração aérea nos animais expostos aos três compostos de maior concentração (20 µg/L), isto pode estar relacionado a apresentação de hemorragias e congestão conforme mencionado anteriormente, porém, os animais expostos ao PV, MV e SV na concentração de 10 µg/L não apresentaram um aumento ou exibição de tal comportamento, apesar de apresentarem hemorragias na região opercular e nadadeiras peitorais.

248

Tabela 4. Eventos comportamentais exibidos por *Danio rerio* adultos. O sombreamento enfatiza os efeitos significativos.

	Controle	Metavanadato de sódio		Pentóxido de vanádio		Sulfato de oxovanádio	
		10 µg/L	20 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	10 µg/L	20 µg/L
NL	5,4 ± 2,4	1,9 + 1,7*	4,3 + 2,7	2,1 + 1,5*	2,5 ± 2,8*	1,3 ± 1,5	1,9 ± 2,1*
NR	1,4 ± 2,1	0,1 + 0,4*	0,3 + 0,8*	0,0*	0,1 ± 0,3*	0,2 ± 0,6*	0,8 ± 2,1
FL	0,4 ± 1,0	3,6 + 2,1*	0,9 + 1,2	0,3 + 0,9	1,2 ± 1,6*	4,4 ± 2,2*	1,3 ± 1,5*
DE	0,5 ± 1,2	0,4 + 0,5	1,9 + 1,2*	1,2 + 1,6*	1,2 ± 1,4*	0,2 ± 0,6	0,6 ± 0,8
NI	0,3 ± 0,6	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
FO	1,4 ± 1,2	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
CA	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
PE	0,3 ± 0,5	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
FU	0,3 ± 0,5	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
RA	0,0 ± 0,2	0,0	1,1 + 1,1*	0,1 + 0,4	0,5 ± 0,5*	0,0	1,7 ± 3,0*

251 Siglas: NL – Nadar Lento; NR – Nadar Rápido; FL – Flutuar; DE – Descansar; NI – Natação Inclinada;
252 FO – Forragear; CA – Capturar; PE – Perseguição; FU – Fuga; RA – Respiração Aérea.

253 4. Discussão

254 A CL_{50} 96 h dos três compostos, metavanadato de sódio, pentóxido de vanádio e
255 sulfato de oxovanádio, foram respectivamente, 74,14 $\mu\text{g/mL}$, 22,48 $\mu\text{g/mL}$ e 53,62
256 $\mu\text{g/mL}$ sendo o pentóxido de vanádio o composto de maior toxicidade. Taylor et al.
257 (1985) submeteram adultos da espécie *Limanda limanda* à exposição de metavanadato
258 de amônio, obtendo uma CL_{50} 96 h de 27,8_(22,1 - 33,0) $\mu\text{g/mL}$. Adultos das espécies
259 *Pimephales promelas* e *Lepomis macrochirus* foram submetidas à exposição de sulfato
260 de oxovanádio e pentóxido de vanádio, obtendo uma CL_{50} 96 h entre 33 e 55 $\mu\text{g/mL}$
261 (Tarzwell e Henderson, 1960 citado por Hohreiter, 1980). Estes valores são similares
262 aos apresentados em nosso estudo mesmo com diferença em relação aos estágios de
263 desenvolvimento do animal. Quanto as taxas de mortalidade apresentadas, estas
264 corroboram com as apresentadas por Ghosh et al. (2015), onde concentrações acima de
265 200 $\mu\text{g/mL}$ provocaram mortalidade em mamíferos. Como o *D. rerio* tem similaridade
266 genética de 70% com os mamíferos (Zorzetto e Guimarães, 2013), isto poderia explicar
267 a relação de mortalidade com a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

268 Os efeitos teratogênicos mais evidentes, no período de 24 e 48 hpf, foram os
269 edemas de pericárdio e saco vitelínico. Em embriões de dourado do mar (*Coryphaena*
270 *hippurus*) expostos ao cloreto de cobre e de tributilestanho também foram observados o
271 edema de saco vitelínico (Adema-Hannes e Shenker, 2008). Os mesmos autores
272 correlacionam este efeito com retardo da função circulatória levando ao acúmulo de
273 líquido. Talvez este efeito também tenha ocorrido nos animais expostos aos compostos
274 de vanádio justificando o aparecimento tanto do edema de pericárdio como o de saco
275 vitelínico.

276 As deformações na coluna e na cauda mais observadas ocorreram apenas nos
277 animais expostos ao metavanadato de sódio. Adema-Hannes e Shenker (2008) também
278 observaram deformações na coluna de *C. hippurus*. Os autores atribuíram este efeito as
279 contrações tetânicas do músculo esquelético devido a um efeito neurotóxico causado
280 pela exposição aguda aos metais. A exposição a metais pode causar danos ao sistema
281 nervoso central, devido a sua sensibilidade à privação de oxigênio, resultando em uma
282 encefalopatia anóxica que pode resultar em contrações tetânicas (JONES et al., 2000).

283 Já o estudo do efeito tóxico dos compostos de vanádio sobre a frequência cardíaca
284 demonstrou que os animais durante a exposição aguda apresentaram variação sobre esta

285 frequência. Estas variações são mencionadas na literatura, mas sabe-se pouco sobre os
286 mecanismos que envolvem as disfunções cardiovasculares (Barjhoux et al., 2012).
287 Porém, as oscilações sem relação direta com a dose não são comuns, Johnson et al.
288 (2007) observaram que embriões de *zebrafish* expostos ao cobre tiveram um aumento
289 significativo na sua frequência cardíaca. Já na exposição de embriões de *zebrafish* ao
290 cádmio, foi observado uma diminuição na frequência cardíaca (Hallare et al., 2005).

291 A observação de parâmetros comportamentais é importante para o entendimento
292 dos processos fisiológicos e ecológicos que ocorrem nos animais submetidos a testes de
293 toxicidade (Scott e Sloman, 2004). Na categoria Locomoção, os adultos de *zebrafish*
294 expostos aos compostos de vanádio apresentaram alterações quanto ao comportamento
295 natatório, mantendo-se em boa parte das observações em estado inativo. Quanto a
296 categoria Resposta ao Estresse, os animais em exposição aos compostos de vanádio na
297 concentração de 20 µg/L apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência
298 de exibição do comportamento respiração aérea. Os resultados destes parâmetros
299 indicam que o efeito tóxico dos três compostos de vanádio nesta concentração
300 compromete o consumo energético do *zebrafish*, onde há uma dificuldade respiratória
301 por parte do animal. Goc (2006) indicou que valores de ingestão diária acima de 10 µg
302 de vanádio causam efeitos tóxicos às membranas da mucosa do ducto respiratório
303 superior, ocasionando fadiga, tosse e depressão. Ghosh et al. (2015) indica que o
304 tratamento com pentóxido de vanádio em ratos causou irritação no trato respiratório
305 superior destes animais. Ainda, a inalação contínua do pentóxido de vanádio causou o
306 surgimento de neoplasias alveolares e bronquiolares (National Toxicology Program,
307 2002). Taylor et al. (1985) indicaram que a espécie *L. limanda* apresentava dificuldade
308 respiratória durante o seu experimento. Estes efeitos descritos para o vanádio podem ter
309 alterado o consumo energético dos animais utilizados em nosso estudo justificando o
310 aumento da frequência de exibição dos comportamentos inativos e a respiração aérea.
311 Ainda, ocorreu avaliação macroscópica dos arcos branquiais (Fig. 2), onde há uma
312 congestão destas regiões que podem confirmar os resultados obtidos no nosso
313 experimento.

314 **5. Conclusões**

315 Foi possível avaliar nos embriões a CL₅₀ 96 h de três compostos de vanádio, onde
316 o pentóxido de vanádio apresentou maior toxicidade. Os efeitos teratogênicos mais
317 observados foram os edemas de pericárdio e saco vitelínico. Os adultos expostos aos
318 compostos de vanádio apresentaram um aumento do batimento opercular e congestão

319 dos arcos branquiais, também foi possível observar uma alteração comportamental,
320 onde eles apresentaram uma frequência de comportamentos inativos e também
321 realizaram respiração aérea.

322 **6. Referências bibliográficas**

323 ADEMA-HANNES, R.; SHENKER, J. Acute lethal and teratogenic effects of
324 tributyltin chloride and copper chloride on mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and
325 larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, n.10, p. 2131-2135, 2008.

326

327 ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, v.48,
328 p.227-267, 1974.

329

330 BARJHOUX, I.; BAUDRIMONT, M.; MORIN, B. et al. Effects of copper and
331 cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias*
332 *latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.79, p.272-282, 2012.

333

334 BRAUNBECK T.; KAIS, B.; LAMMER, E. et al. The fish embryo test (FET): origin,
335 applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*, v.22, p.16247-
336 16261, 2015.

337

338 CLARK M.; HOENIG, M. Metabolic effects of obesity and its interaction with
339 endocrine diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. V.46,
340 n.5, p.797-815, 2016.

341

342 DOMINGO, J.L.; GÓMEZ, M. Vanadium compounds for the treatment of human
343 diabetes mellitus: A scientific curiosity? A review of thirty years of research. *Food and*
344 *Chemical Toxicology*, v.95, p.137-141, 2016.

345

346 GHOSH, S.K.; SAHA, R.; SAHA B. Toxicity of inorganic vanadium compounds.
347 *Research on Chemical Intermediates*, v.41, p.4873-4897, 2015.

348

349 GOC, A. Biological activity of vanadium compounds. *Central European Journal of*
350 *Biology*, v. 1, n.3, p.314-332, 2006.

351

- 352 GUYTON, A.C. Tratado de fisiologia médica. Arthur C. Guyton, John E. Hall. 11th ed.
353 Tradução de Barbara de Alencar Martins et al. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2006.
354 1115p.
355
- 356 HALLARE, A.V.; SCHIRLING, M.; LUCKENBACK, T. et al. Combined effects of
357 temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in
358 zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, v.30, p.7-17, 2005.
359
- 360 HOHREITER, D.W. Toxicities of selected substances to freshwater biota. Argonne
361 National Laboratory, 1980. Disponível em:
362 <http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/5287745>. Acessado em: 21 de fev. 2017.
363
- 364 IMTIAZ, M.; RIZWAN, M.S.; XIONG, S. et al. Vanadium, recent advancements and
365 research prospects: A review. *Environment International*, v.80, p.79-88, 2015.
366
- 367 JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K.A. The effects of copper on the
368 morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*,
369 v.84, p.431-438, 2007.
370
- 371 JONAS, A.; SCHOLZ, S.; FETTER, E. et al. Endocrine, teratogenic and neurotoxic
372 effects of cyanobacteria detected by cellular *in vitro* and zebrafish embryo assays.
373 *Chemosphere*, v.120, p.321-327, 2015.
374
- 375 JONES, T.M., HUNT, R.D., KING, N.W. Patologia veterinária. Thomas Carlyle Jones,
376 Ronald Duncan Hunt, Norval William King. 6th ed. Tradução de Dr. Fernando Gomes
377 do Nascimento et al. Barueri – SP: Editora Manole Ltda, 2000. 1415 p.
378
- 379 KALUEFF, A.V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A.M. et al. Towards a comprehensive
380 catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, v.10, p.70-86, 2013.
381
- 382 National Toxicology Program. Technical report on the studies of vanadium pentoxide
383 (CAS no. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). Department
384 of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health,
385 National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC, 2002.

386

387 NEUMANN, S.; LINEK, J.; LOESENBECK, G. et al. TGF- β 1 serum concentrations
388 and receptor expressions in the lens capsular of dogs with diabetes mellitus. *Open*
389 *Veterinary Journal*. V.7, n.1, p.12-15, 2017.

390

391 OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic
392 systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Paris, France: Organization
393 for Economic Cooperation and Development. 2013.

394

395 ÖHLUND, M.; EGENVALL, A.; FALL, T. et al. Environmental risk factors for
396 diabetes mellitus in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.31, p.29-35, 2017.

397

398 SCHOLZ, S.; SELA, E.; BLAHA, L. et al. A european perspective on alternatives to
399 animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regulatory*
400 *Toxicology and Pharmacology*, v.67, p.506-530, 2013.

401

402 SCOTT, G.R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex
403 fish behaviour: integrant behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic*
404 *Toxicology*, v.68, p.369-392.

405

406 TAYLOR, D.; MADDOCK, B.G.; MANCE, G. The acute toxicity of nine 'grey list'
407 metals (arsenic, boron, chromium, copper, lead, nickel, tin, vanadium and zinc) to two
408 marine fish species: dab (*Limanda limanda*) and grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquatic*
409 *Toxicology*, v.7, p.135-144, 1985.

410

411 WESTERFIELD, M. The zebrafish book: A guide for laboratory use of zebrafish
412 (*Danio rerio*), 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene

413

414 YANG, Y.; QI, S.; WANG, D. et al. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio*
415 *rerio*). *Journal of Hazardous Materials*, v.307, p.127-136, 2016.

416

417 ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. **Pesquisa Fapesp**, Ed. 209,
418 p.16-21, 2013.

ANEXO 1



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



CEUA - UFRPE
Aprovado em
06/02/2017
Validade
05/02/2018

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	028/2016
Número do processo	23082.002254/2016
Data de emissão da licença	06 de fevereiro de 2017
Título do Projeto	Uso de complexo Mimetico de Vanádio modificado no tratamento a diabetes e testes de toxicidade utilizando um Modelo Animal Alternativo, o Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).
Finalidade (Ensino, Pesquisa, extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Marleyne José Afonso Acciuly Lins Amorim
Colaboradores	Tiago Queiroz da Mota Bittencourt; Pabyton Gonçalves Cadena: Thamiris Pinheiro Santos.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe: Zebra fish: Total 88 animais (machos e fêmeas).

ANEXO 2

19/04/2017

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. - Instruções aos autores



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Atualizado: 09/08/2016

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será

feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*. * na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:**1. Citações no texto**

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences,

1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Convenirar <http://convenirar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.
OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item "Justification" (Step 6), e

19/04/2017

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. - Instruções aos autores

também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.

- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

© 2001-2007 Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte MG Brasil
Tel: +55 31 3409-2042
Tel: +55 31 3409-2041



abmvz.artigo@abmvz.org.br