



Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*)

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

T.Q.M. Bittencourt, A.R. Santos, M.C.G. Silva, J.F. Silva, N.P.C. Silva, W.E. Silva, P.G. Cadena*, M.J.A.A.L. Amorim

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

RESUMO

Foram avaliados os efeitos tóxicos do metavanadato de sódio (MV), pentóxido de vanádio (PV) e sulfato de oxovanádio (SV), potenciais fármacos antidiabéticos, em embriões e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*). Os embriões foram expostos a concentrações de 10-1000µg/mL para avaliação da CL₅₀ 96h e seus efeitos teratogênicos. Os adultos foram expostos a 10 e 20µg/mL dos mesmos compostos para se avaliarem alterações comportamentais relacionadas à exposição química e à mortalidade. A CL₅₀ 96h foi de 22,48, 53,62 e 74,14µg/mL para MV, SV e PV, respectivamente. Houve 100% de mortalidade nas concentrações de 400-1000µg/mL dos três compostos. Os efeitos teratogênicos mais observados (P<0,05) nos embriões foram edemas de pericárdio e saco vitelínico. Foram constatados, nos animais adultos expostos aos compostos de vanádio, maior batimento opercular e congestão nos arcos branquiais. A exibição dos comportamentos Flutuar e Descansar nos adultos expostos foi significativa (P<0,05), como também a exibição do comportamento Respiração Aérea. Pode-se concluir que a exposição química aos compostos de vanádio causou efeitos tóxicos em embriões e adultos de *zebrafish* com alta mortalidade. Diante disso, o seu uso como potencial fármaco antidiabético deve ser mais bem estudado em razão do efeito tóxico dessas substâncias.

Palavras-chave: teste de toxicidade, efeitos teratogênicos, comportamento animal

ABSTRACT

The toxic effects of sodium metavanadate (MV), vanadium pentoxide (PV) and oxovanadium sulfate (SV), potential antidiabetic drug, on embryos and adults of zebrafish (Danio rerio) were evaluated. Embryos were exposed to concentrations of 10-1000µg/mL for evaluation of 96-h LC₅₀ and their teratogenic effects. Adults were exposed to 10 and 20µg/mL of the same compounds to evaluate behavioral changes related to chemical exposure and mortality. The 96-h LC₅₀ were 22.48, 53.62, and 74.14µg/mL for MV, SV, and PV, respectively. Mortality of 100% was observed at the concentrations of 400-1000µg/mL of the three compounds. The teratogenic effects most observed (P<0.05) were pericardial and yolk sac edemas. Adult animals exposed to the vanadium compounds had higher opercular beats and congestion in the gill arches. The exhibition of behaviors Floating and Resting in the exposed adults was significant (P<0.05), as well as the Air breathing behavior. Chemical exposure to vanadium compounds caused toxic effects in embryos and adults of zebrafish with high mortality. In conclusion, its use as a potential antidiabetic drug should be better studied due to the toxic effect.

Keywords: toxicity test, teratogenic effects, animal behavior

Recebido em 2 de maio de 2017

Aceito em 29 de agosto de 2017

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: pabyton.cadena@ufrpe.br

INTRODUÇÃO

O vanádio tem recebido uma atenção especial da área farmacêutica, pois pode ter ação como agente terapêutico alternativo, diminuindo os níveis de glicose sanguínea em pacientes diabéticos (Pathak e Lahkar, 2015; Goc, 2006). Esse metal transicional apresenta as valências mais comuns de +3, +4 e +5, e as formas tetravalentes (V^{IV}), como sulfato de oxovanádio, as formas pentavalentes (V^V), como o metavanadato de sódio e o pentóxido de vanádio, apresentaram redução nos níveis de glicose sanguínea em animais (Barceloux, 1999; Willsky et al., 2001; Cheta et al., 2003; Pathak e Lahkar, 2015). Mesmo sendo proposto como alternativa para o tratamento do diabetes, recentemente foi estabelecido como poluente ambiental e tóxico aos seres humanos, provocando alterações fisiológicas e anatômicas quando administrado por via oral (Ghosh et al., 2015). Pode ser encontrado no ambiente em concentrações de 10 a 220 $\mu\text{g/L}$ e em dosagens superiores, como fármaco para o tratamento do diabetes (Barceloux, 1999; Ghosh et al., 2015). As formas pentavalentes são mais tóxicas, porém os efeitos tóxicos do vanádio não são bem conhecidos em modelos animais como peixes.

Diante disso, os testes de toxicidade são de importância para a avaliação dos efeitos causados por produtos químicos (Scholz et al., 2013), e os peixes são os principais vertebrados utilizados na avaliação de toxicidade (Braunbeck et al., 2015). O *zebrafish* (*Danio rerio*) foi estabelecido, em 2013, pela OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), como modelo para avaliação de testes de toxicidade agudos e crônicos causados por produtos químicos (OECD, 2013). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos de três compostos de vanádio, potenciais fármacos antidiabéticos, para a determinação da CL_{50} 96h, mortalidade e estudo dos efeitos teratogênicos e cardiovasculares em embriões, bem como para alterações comportamentais em adultos de *D. rerio*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia Animal – Leca. Todas as metodologias utilizadas no projeto foram previamente aprovadas pela Comissão de

Ética no Uso de Animais (Ceua-UFRPE), licença 028/2016. Os compostos de vanádio utilizados foram o sulfato de oxovanádio (V^{IV}) (O_5SV) (Lote # MKBV2295V), o metavanadato de sódio (V^V) ($NaVO_3$) (Lote # MKCB0474V) e o pentóxido de vanádio (V^V) (V_2O_5) (Lote # MKBZ4641V) (SIGMA, EUA). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Os testes de toxicidade aguda dos compostos de vanádio em embriões de *D. rerio* seguiram as recomendações da OCDE 236 (2013). Os embriões de *D. rerio* foram obtidos mediante aplicação do protocolo de Westerfield (2000), sendo utilizados machos e fêmeas na proporção de 2:1 em aquários de reprodução, com fotoperíodo de 14/10 horas de claro e escuro, respectivamente. Após a desova, os ovos foram recolhidos e observados por meio de microscópio óptico de luz (com lâmpada LED) 1hpf. Aqueles que demonstraram desenvolvimento do embrião foram acondicionados em reservatórios estéreis de poliestireno de 80mL ($n=10$), com pH $7,0\pm 0,5$ e temperatura ambiente de $26\pm 1^\circ\text{C}$; já os que não apresentaram desenvolvimento embrionário ou lesões no córion foram descartados. Os embriões foram expostos às diferentes concentrações dos compostos sulfato de oxovanádio (SV) (V^{IV}), metavanadato de sódio (MV) (V^V) e pentóxido de vanádio (PV) (V^V), além do grupo controle (em triplicatas autênticas) em teste de toxicidade aguda, de acordo com OECD 236 (2013). As concentrações aplicadas foram 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, baseadas nas concentrações utilizadas com esses compostos para o tratamento do diabetes (Ghosh et al., 2015). Os efeitos teratogênicos observados foram: edema de pericárdio, edema do saco vitelínico, deformação na coluna, deformação na cauda e coagulação (Jonas et al., 2015), frequência cardíaca (Yang, 2016) e mortalidade, avaliados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96hpf. Para a determinação da CL_{50} 96h, foi utilizado o método de *Probit*, por meio do *software* Biostat Pro 5.9.9.2.

As concentrações dos compostos de vanádio para os ensaios com os adultos foram indicadas após avaliação da CL_{50} 96h dos embriões, resultando em valores de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a 50% e 100% CL_{50} 96h do composto mais tóxico, respectivamente. Os adultos de *D. rerio* foram obtidos comercialmente, aclimatados por cinco dias em aquários de 20 litros aerados, com

Efeitos tóxicos...

temperatura ambiente de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo natural. A água utilizada foi tratada com tiosulfato de sódio para redução do cloro e com hidróxido de sódio para ajuste do pH para $7,0\pm 0,5$. O pH da água foi mantido neutro em todos os experimentos, a fim de evitar processos oxidativos nos compostos de vanádio, o que poderia alterar a sua toxicidade. Durante o período de aclimação, os animais foram alimentados com ração extrusada (45% de proteína bruta) uma vez ao dia. Após o período de aclimação, os animais foram divididos em sete grupos ($n=10$) em aquários (8 litros), onde foram expostos aos três compostos de vanádio diluídos na água, nas concentrações nominais de 10 e $20\mu\text{g/mL}$, além de um grupo controle por 30 dias. Para a avaliação comportamental, foi construído um etograma para *D. rerio* pelo método *ad libitum* (Altmann, 1974) baseado nas informações comportamentais fornecidas por Kalueff *et al.* (2013). O comportamento dos animais expostos aos compostos de vanádio foi avaliado pelo método de varredura instantânea (Altmann, 1974) em um ponto fixo, para não influenciar no comportamento dos animais por 30min, sendo intercalado um minuto de observação com um minuto de intervalo, para

cada aquário. Adicionalmente, foi observada a mortalidade diária dos animais; aqueles que foram a óbito tiveram a região opercular dissecada para a averiguação da *causa mortis*.

Os efeitos teratogênicos dos embriões e os comportamentos dos adultos foram estatisticamente avaliados por meio da análise de variância simples (*One Way ANOVA*). Quando o resultado foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA, USA).

RESULTADOS

Os resultados da CL_{50} 96h em embriões de *Danio rerio* expostos aos três compostos de vanádio, seguindo a norma da OCDE 236 (2013), são mostrados na Tab. 1. Observa-se que PV apresentou a menor CL_{50} 96h, indicando que ele possui maior toxicidade. Já o MV apresentou a maior CL_{50} 96h, indicando que ele foi o menos tóxico.

Tabela 1. Concentração letal ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos de vanádio para exposição aguda de embriões de *Danio rerio* em 96 horas. CL_{50} ou CL_{90} (IC 95%) – concentração letal e intervalo de confiança em 95%. GL – 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%)	GL	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%)	GL	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%)	GL	χ^2	
53,62 _(-1,14 – 108,38)	186,53	3	2,82	

Após 96h de exposição aos compostos de vanádio, foram observados 100% de mortalidade nos animais expostos às concentrações de 400 a $1000\mu\text{g/mL}$. Em concentrações abaixo de

$200\mu\text{g/mL}$ (Tab. 2), foi observada maior sobrevivência dos animais e, conseqüentemente, os efeitos subletais.

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 96hpf. 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

Tempo	Composto	Controle	Metavanadato de sódio (MV) (V ^V)					Pentóxido de vanádio (PV) (V ^V)			Sulfato de oxovanádio (SV) (V ^{IV})	
			0	10	50	100	200	10	50	100	10	50
	Concentrações (µg/mL)	0	10	50	100	200	10	50	100	10	50	
	Efeito (%)											
	Mortalidade (%)	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	
24h	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	
	Mortalidade (%)	0	0	0	0	53,3	0	3,3	0	0	3,3	
48h	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	1,0±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	
	Mortalidade (%)	3,33	0	6,7	46,7	93,3	0	13,3	10	0	10	
72h	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*	
	Mortalidade (%)	0	6,7	33,4	90	96,6	6	70	90	6,7	50	
96h	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*	

A Tab. 2 apresenta os efeitos teratogênicos para cada concentração (0 – 200µg/mL) dos compostos de vanádio em razão da hora pós-fertilização (hpf). Em 24hpf, foi observado o edema de pericárdio (EP) ($P<0,05$) na maioria dos animais expostos aos compostos de vanádio, exceto nos animais expostos ao MV em 200µg/mL ($P>0,05$) e ao PV em 100µg/mL ($P>0,05$). O edema de saco vitelínico (ESV) foi observado ($P<0,05$) em todos os animais expostos, nas concentrações de 50 e 100µg/mL de MV, de 10 e 50µg/mL de PV e de 50µg/mL de SV. Esses resultados indicam que os compostos de vanádio podem causar alterações cardiovasculares, mas esse efeito não é dependente da dose. Já em relação à frequência cardíaca, foram observadas alterações significativas ($P<0,05$) em todos os animais expostos às concentrações de MV e 50µg/mL de PV, novamente sem relação direta com a dose utilizada.

Em 48hpf, o edema de pericárdio foi observado ($P<0,05$) na maioria dos animais expostos aos compostos de vanádio, exceto nos animais expostos às menores concentrações de PV e SV (10µg/mL). O edema de saco vitelínico foi observado ($P<0,05$) em todos os animais expostos às concentrações de 50µg/mL de MV, de 10µg/mL de PV e em todas as concentrações de SV. Assim como em 24hpf, esses efeitos não foram dependentes da dose e a frequência com que ocorriam nos animais foi semelhante. Foram observadas ($P<0,05$) alterações na frequência cardíaca em todos os animais expostos às maiores concentrações (acima de 50µg/mL) dos compostos de vanádio (Tab. 2) sem relação direta com a dose utilizada.

Em 72hpf, o edema de pericárdio foi observado ($P<0,05$) nos animais expostos às concentrações 10 – 100µg/mL de MV, 10µg/mL de PV e 50µg/mL de SV sem relação com a dose utilizada. Já o edema de saco vitelínico não foi observado ($P>0,05$) nos animais expostos aos compostos de vanádio. Diante disso, observa-se que, com o desenvolvimento dos animais, houve uma redução na frequência de aparecimento dos edemas. Apenas após 72hpf foram observadas deformações relacionadas à cauda e à coluna. O efeito de deformação na coluna (DC) foi observado ($P<0,05$) apenas nos animais expostos à

concentração de 50µg/mL de MV. Já em relação ao efeito de deformação na cauda (DCau), este foi constatado ($P<0,05$) nos animais expostos ao MV na concentração de 10µg/mL. As alterações na frequência cardíaca foram observadas, sem relação com a dose, nos animais expostos ao MV. Já em relação ao PV e SV, foi notada uma redução da frequência cardíaca com o aumento da concentração dos compostos ($P<0,05$), sendo esse efeito mais evidente no SV (Tab. 2).

Em 96hpf, o edema do pericárdio (EP) foi observado ($P<0,05$) nos animais expostos à concentração de 10µg/mL de PV. Esse resultado indica, como mencionado acima, uma redução no aparecimento de edemas com o desenvolvimento do animal. Já em relação à deformação na cauda (DCau), esta foi constatada ($P<0,05$) apenas nos animais expostos à concentração de 10µg/mL de MV. Já em relação à frequência cardíaca, o efeito de redução de modo dependente da dose não foi mais observado em PV e SV. Adicionalmente, a Fig. 1 apresenta os efeitos teratogênicos que ocorreram nos embriões de *D. rerio* submetidos às diferentes concentrações dos três compostos de vanádio em 24, 48, 72 e 96hpf.

Durante o período de exposição aos três compostos de vanádio (concentração de 20µg/L) nos adultos submetidos a teste de toxicidade crônica, foi possível observar um aumento qualitativo do batimento opercular e da natação próximo à linha d'água. Esses indivíduos também apresentaram hemorragias nas regiões do opérculo e nas nadadeiras peitorais e, após dissecação da região opercular, foi possível observar os arcos branquiais com congestão (Fig. 2).

Para os estudos comportamentais, dentre os dados obtidos por meio do método *ad libitum* (Altmann, 1974) para a elaboração do etograma, foram observados 10 comportamentos extraídos de Kalueff *et al.* (2013), agrupados nas categorias: Locomoção, Alimentação, Social e Resposta ao Estresse, os quais podem ser observados na Tab. 3. Esse etograma se apresenta de forma mais simples que o relatado por Kalueff *et al.* (2013), enfatizando comportamentos que podem ser afetados em testes de toxicidade.

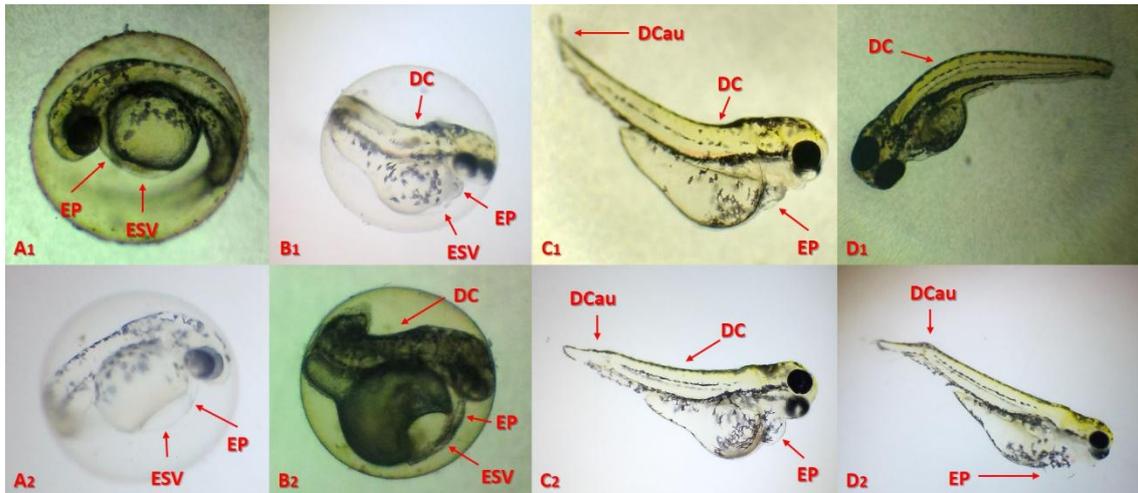


Figura 1. Efeitos subletais observados em embriões de *Danio rerio* após exposição aos compostos de vanádio. A1 e A2: Embriões expostos por 24hpf. B1 e B2: Embriões expostos por 48hpf. C1 e C2: Embriões expostos por 72hpf. D1 e D2: Embriões expostos por 96hpf. Siglas: EP – edema de pericárdio; ESV – edema de saco vitelínico; DC – deformação na coluna; DCau – deformação na cauda.

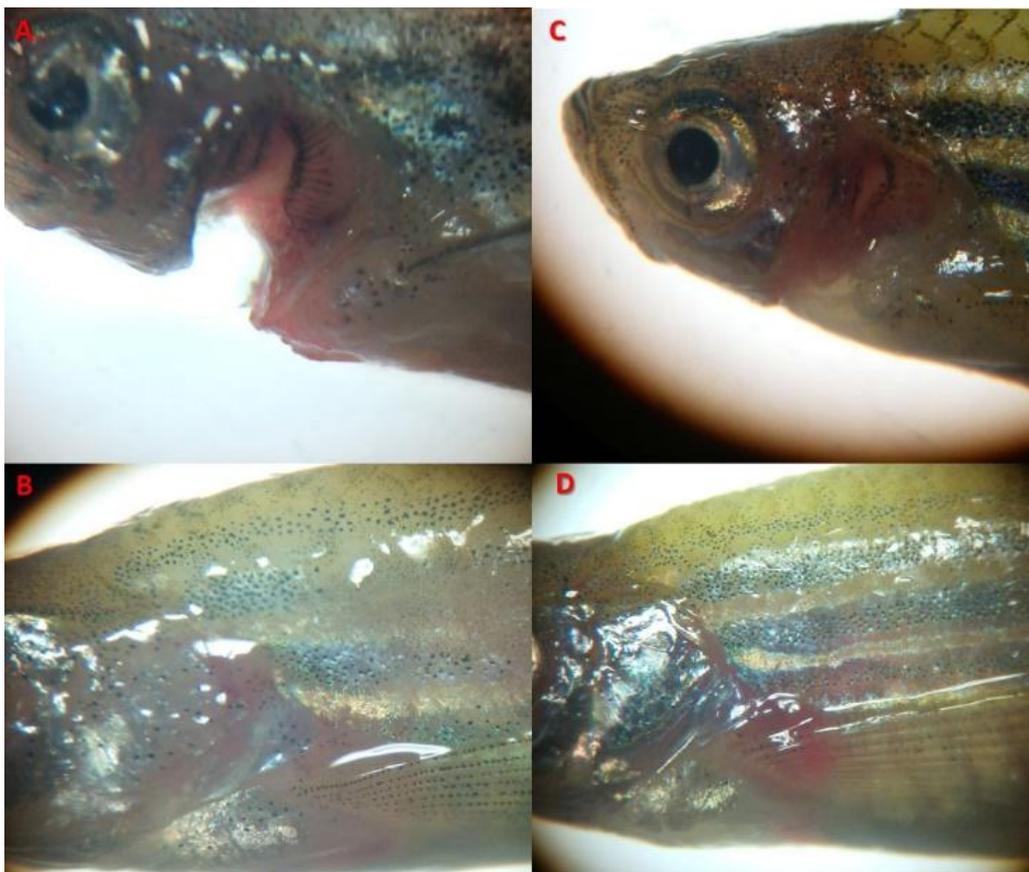


Figura 2. *Danio rerio* expostos aos compostos de vanádio: (A e C) arcos branquiais apresentando congestão, (B e D) hemorragias na região opercular e nadadeiras peitorais.

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

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

Com a construção do etograma, foi possível a realização das observações comportamentais dos animais expostos aos compostos de vanádio pelo método de varredura instantânea (Altmann, 1974). A Tab. 4 apresenta o número de eventos comportamentais nos animais expostos aos compostos de vanádio. Na categoria Locomoção, foi possível observar uma redução ($P < 0,05$) do número de eventos dos comportamentos Nadar Lento, Nadar Rápido e Natação Inclinada. Após a análise dos resultados, observa-se uma redução da exibição de comportamentos ativos por parte dos animais expostos, o que pode estar relacionado à intoxicação com os compostos de vanádio.

Já em relação aos comportamentos Flutuar e Descansar, foi observado um aumento ($P < 0,05$) do número de eventos nos animais expostos. Isso indica um aumento da exibição de comportamentos inativos e pode estar também relacionado com uma possível intoxicação pelos compostos de vanádio.

Ainda na Tab. 4, na categoria Alimentação, os animais expostos aos três compostos de vanádio,

em suas diferentes concentrações, apresentaram uma redução ($P < 0,05$) do número de eventos no comportamento Forragear em relação ao controle. Isso indica uma redução na procura por alimento. Já para a categoria Social, foi observada uma redução ($P < 0,05$) do número de eventos dos comportamentos Perseguir e Fuga dos animais expostos aos compostos de vanádio. Os comportamentos das categorias Alimentação e Social também são comportamentos ativos que podem ser afetados pela exposição aos compostos de vanádio.

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

Tabela 4. Número de eventos comportamentais exibidos por *Danio rerio* adultos

	Controle	Metavanadato de sódio		Pentóxido de vanádio		Sulfato de oxovanádio	
		10µg/L	20µg/L	10µg/L	20µg/L	10µg/L	20µg/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*

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

DISCUSSÃO

Os três compostos de vanádio utilizados no estudo apresentaram efeitos tóxicos tanto nos embriões como nos adultos de *D. rerio*. A CL₅₀ 96h dos três compostos, metavanadato de sódio (V^V), pentóxido de vanádio (V^V) e sulfato de oxovanádio (V^{IV}), foram, respectivamente, 74,14µg/mL, 22,48µg/mL e 53,62µg/mL, sendo o pentóxido de vanádio (V^V) o composto de maior toxicidade. Ainda, observa-se que o efeito letal não foi dependente do grau de oxidação do vanádio. Esses valores são similares aos apresentados nos estudos de Taylor *et al.* (1985), com metavanadato de amônio (V^V), e de Hohreiter (1980), com sulfato de oxovanádio (V^{IV}) e pentóxido de vanádio (V^V), mesmo com diferença em relação aos estágios de desenvolvimento do animal. Quanto às mortalidades apresentadas, estas corroboram as apresentadas por Ghosh *et al.* (2015), em cujo estudo concentrações acima de 200µg/mL provocaram mortalidade em mamíferos. Como o *D. rerio* tem similaridade genética de 70% com os mamíferos (Zorzetto e Guimarães, 2013), isso poderia explicar a relação de mortalidade com as concentrações acima de 200µg/mL.

Os efeitos teratogênicos mais evidentes, independentemente da forma de oxidação, nos períodos de 24 e 48hpf, foram os edemas de pericárdio e saco vitelínico. Embriões de *D. rerio*, nas primeiras 48 horas de desenvolvimento, são capazes de manter o equilíbrio osmótico antes mesmo do surgimento do rim, por uma barreira de permeabilidade à água na superfície do embrião (Hill *et al.*, 2004). Uma vez que o vanádio tem efeito inibitório

sobre o funcionamento da Na⁺K⁺ATPase (Akera *et al.*, 1983; Searle *et al.*, 1983), isso pode levar ao acúmulo de líquido, provocando os edemas. Com o desenvolvimento do animal e o aparecimento do rim pronefro (Hill *et al.*, 2004), esse efeito pode ter sido minimizado após 48hpf, como evidenciado nos resultados do presente estudo (Tab. 2). Já os resultados do efeito tóxico dos compostos de vanádio sobre a frequência cardíaca demonstraram que os animais apresentaram variação dessa frequência, sem relação com a dose. As alterações de frequência cardíaca podem estar relacionadas com alterações na pressão arterial. Coderre e Srivastava (2004) demonstraram que a pressão arterial diminuiu em ratos diabéticos com a administração de compostos de vanádio; já Akera *et al.* (1983) observaram que o ortovanadato de sódio (V^V) elevou ou reduziu a pressão arterial em animais hígidos. Isso pode indicar que o resultado encontrado no presente estudo sobre a frequência cardíaca pode ter relação com as variações de pressão arterial, o que justificaria o observado na Tab. 2.

As deformações na coluna e na cauda mais observadas ocorreram apenas nos animais expostos ao metavanadato de sódio (V^V). Íons vanadato são conhecidos por inibirem a Ca²⁺ATPase transmembrana do retículo sarcoplasmático, o que dificulta a recaptação de Ca²⁺ e, por conseguinte, pode levar ao acúmulo deste (Aureliano e Crans, 2009), provocando contrações tetânicas (Jones *et al.*, 2000). Isso poderia justificar as deformações na coluna e na cauda observadas no presente estudo.

A observação de parâmetros comportamentais é importante para o entendimento dos processos fisiológicos e ecológicos que ocorrem nos animais submetidos a testes de toxicidade (Scott e Sloman, 2004). Na categoria Locomoção, os adultos de *zebrafish* expostos aos compostos de vanádio apresentaram alterações quanto ao comportamento natatório, mantendo-se, em boa parte das observações, em estado inativo. Quanto à categoria Resposta ao Estresse, os animais em exposição aos compostos de vanádio na concentração de 20µg/L apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) na frequência de exibição do comportamento Respiração Aérea. Os resultados desses parâmetros indicam que o efeito tóxico dos três compostos de vanádio nessa concentração comprometeu o consumo energético do *zebrafish*, pois há uma dificuldade respiratória por parte do animal. Goc (2006) indicou que valores de ingestão diária acima de 10µg de vanádio causam efeitos tóxicos às membranas da mucosa do ducto respiratório superior, ocasionando fadiga, tosse e depressão. Aind, Ghosh *et al.* (2015) mostraram que o tratamento com pentóxido de vanádio (V^V) em ratos causou irritação no trato respiratório superior desses animais. Por fim, a inalação contínua do pentóxido de vanádio (V^V) causou o surgimento de neoplasias alveolares e bronquiolares (Technical..., 2002). Taylor *et al.* (1985) observaram que a espécie *Limanda limanda* apresentou dificuldade respiratória durante o seu experimento. Esses efeitos descritos para o vanádio podem ter alterado o consumo energético dos animais utilizados no presente estudo, o que justifica o aumento da frequência de exibição dos comportamentos inativos e a Respiração Aérea. Ainda, ocorreu avaliação macroscópica dos arcos branquiais (Fig. 2), onde há uma congestão dessas regiões, que pode confirmar os resultados obtidos neste experimento.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a exposição química aos compostos de vanádio propostos como terapia alternativa para o tratamento do diabetes, independentemente do grau de oxidação, causou efeitos teratogênicos em embriões, como edemas, deformações físicas e variações na frequência cardíaca, com alta mortalidade. Nos adultos, houve aumento de comportamentos inativos e relacionados ao estresse. Entre os três

compostos estudados, o que apresentou maior toxicidade foi o pentóxido de vanádio (V^V). As concentrações utilizadas neste estudo foram propostas como terapia alternativa para o tratamento do diabetes. Diante disso, o seu uso como um potencial produto antidiabético em animais e em humanos deve ser mais bem estudado em razão do efeito tóxico desses compostos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por permitir o desenvolvimento deste projeto; à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida; e à Facepe (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pelo apoio financeiro (APQ-0933-2.08/15).

REFERÊNCIAS

- AKERA, T.; TEMMA, K.; TAKEDA, K. Cardiac actions of vanadium. *Fed. Proc.*, v.42, p.2984-2988, 1983.
- ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, v.48, p.227-267, 1974.
- AURELIANO, M.; CRANS, D.C. Decavanate ($V_{10}O^{6-}_{28}$) and oxovanadates: oxometalates with many biological activities. *J. Inorg. Biochem.*, v.103, p.536-546, 2009.
- BARCELOUX, D.G. Vanadium. *Clin. Toxicol.*, v.37, p.265-278, 1999.
- BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E. *et al.* The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v.22, p.16247-16261, 2015.
- CHETA, D.; ORASANU, G.; NICOLAIE, T. *et al.* The influence of sodium metavanadate on the process of diabetogenesis in BB rats. *J. Cell. Mol. Med.*, v.7, p.447-454, 2003.
- CODERRE, L.; SRIVASTAVA, A.K. Vanadium and cardiomyocyte functions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.82, p.833-839, 2004.
- GHOSH, S.K.; SAHA, R.; SAHA, B. Toxicity of inorganic vanadium compounds. *Res. Chem. Intermediat.*, v.41, p.4873-4897, 2015.

- GOC, A. Biological activity of vanadium compounds. *Cent. Eur. J. Biol.*, v.1, p.314-332, 2006.
- HILL, A.J.; BELLO, S.M.; PRASCH, A.L. et al. Water permeability and TCDD-induced edema in zebrafish early-life stages. *Toxicol. Sci.*, v.78, p.78-87, 2004.
- HOHREITER, D.W. *Toxicities of selected substances to freshwater biota*. [s.l.]: Argonne National Laboratory, 1980. Available in: <<http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/5287745>>. Accessed in: 21 Feb. 2017.
- JONAS, A.; SCHOLZ, S.; FETTER, E. et al. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular *in vitro* and zebrafish embryo assays. *Chemosphere*, v.120, p.321-327, 2015.
- JONES, T.M.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia veterinária*. 6.ed. Barueri: Manole, 2000. 1415p.
- KALUEFF, A.V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A.M. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, v.10, p.70-86, 2013.
- 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.
- PATHAK, P.; LAHKAR, M.A. comparative study of vanadium pentoxide and chromium oxide in streptozotocin induced diabetes in albino rats. *Int. J. Pharmacol. Sci. Res.*, v.6, p.4843-4846, 2015.
- SCHOLZ, S.; SELA, E.; BLAHA, L. et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.67, p.506-530, 2013.
- SCOTT, G.R.; SLOMAN, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrant behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.*, v.68, p.369-392, 2004.
- SEARLE, B.M.; HIGASHINO, H.; KHALIL, F. et al. Vanadate Effect on the Na,K-ATPase and the Na-K Pump in In Vitro-Grown Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.*, v.53, p.186-191, 1983.
- TAYLOR, D.; MADDOCK, B.G.; MANCE, G. The acute toxicity of nine 'grey list' metals (arsenic, boron, chromium, copper, lead, nickel, tin, vanadium and zinc) to two marine fish species: dab (*Limanda limanda*) and grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquat. Toxicol.*, v.7, p.135-144, 1985.
- TECHNICAL report on the studies of vanadium pentoxide (CAS no. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). Department of Health and Human Services, 2002. Available in: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr507.pdf>. Accessed in: 10 Jan. 2017.
- WESTERFIELD, M. The zebrafish book: a guide for laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Oregon: University of Oregon Press, 2000. Available in: <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html>. Accessed in: 1 Dec. 2016.
- WILLSKY, G.R.; GOLDFINE, A.B.; KOSTYNIK, P.J. et al. Effect of vanadium(IV) compounds in treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.*, v.85, p.33-42, 2001.
- YANG, Y.; QI, S.; WANG, D. et al. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *J. Hazard. Mater.*, v.307, p.127-136, 2016.
- ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. *Pesqui. Fapesp*, 2013. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2013/07/12/um-peixe-modelo/>>. Acessado em: 20 nov. 2016.