ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO FÍGADO E NAS BRÂNQUIAS DE GIRINOS DE *Lithobates catesbeianus* INDUZIDAS POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Gabriel H. L. Rodrigues[1], Rodrigo C. Yamakami[2], Sérgio V. Azevedo[3], Rodrigo Zieri[4]

[1]IFSP- campus Barretos. Lopes.henrique@aluno.ifsp.edu.br

Palavras-chave: Hepatócitos, Epitélio branquial, Biopesticidas, Rã-touro

Introdução

A Agenda 2030 das Nações Unidas reflete uma mobilização internacional em busca de práticas mais responsáveis nos âmbitos econômico, social e ambiental (ODS, 2015). Nesse contexto, a substituição e diminuição do uso de agrotóxicos são essenciais. Entre as práticas voltadas para esse processo destaca-se a utilização de microrganismos benéficos que atendam às demandas agrícolas (Graças et al, 2015). Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizhium* e *Beauveria* estão entre os microrganismos que atuam no controle de insetos-pragas agrícolas (Rehner; Buckley, 2005; Roberts; Stleger, 2004). Com o intuito de contribuir para a produção de alternativas aos agroquímicos, realizamos ensaios ecotoxicológicos com bioprodutos à base das estirpes IBCB 383 de *Metarhizhium anisopliae* e IBCB 170 de *Beuveria bassiana* isoladas pelo Instituto Biológico de Campinas, em larvas de *Lithobates catesbeianus* por meio de análises histomorfométricas.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar, por meio de análises histomorfométricas, a resposta das brânquias e fígado de larvas de *L. catesbeianus,* órgãos de função respiratória e metabólica, respectivamente, frente à exposição subletal dos compostos à base dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (IBCB 170) e *M. anisopliae* (IBCB 383).

Objetivos Específicos

- Analisar o arranjo do tecido hepático, a organização das fileiras de hepatócitos e a arquitetura estromal;
- Analisar a morfometria dos hepatócitos;
- Analisar o arranjo a composição histológica das brânquias;
- Analisar alterações na espessura do epitélio branquial;
- Comparar estatisticamente os resultados entre os grupos experimentais.

Material e Métodos

Foram coletados 72 indivíduos na fase larval, adquiridos no ranário RANAMAT (Matão-SP) e levados ao laboratório de Ecotoxicologia de Animais Aquáticos do IFSP, campus Barretos. Os animais foram aclimatados por 15 dias em caixas plásticas com capacidade de 50 litros cada. Foi utilizada água declorada e alimentação com ração floculada para peixes *ad libitum*. Após, os 36 girinos foram expostos por 96h às concentrações de 0 ml/l (controle) e 10 ml/l (C10) de *B. bassiana* e outros 36 expostos às mesmas concentrações de *M. anisopliae*. A dosagem estabelecida foi baseada em trabalho prévio (Lopes et al., 2024) e pode ser considerada uma superdosagem de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2024). Para análises histomorfométricas, os animais foram anestesiados com lidocaína tópica e tiveram o fígado retirado por meio de incisão mediana

ventral da cavidade torácico-abdominal. Fragmentos do fígado foram fixados em solução de Metacarn e encaminhados à rotina histológica. O material incluído em historresina (Paraplast – Sigma), foram cortados em micrótomo Leica em secções de 5 µm e corados com HE. Em seguida, foram fotodocumentadas 10 secções histológicas por indivíduo com uso de câmera digital (Leica DF495) acoplado ao microscópico (Leica DM 4000B). Para análise de morfometria hepática, foram analisadas 10 imagens (40x) por indivíduo e obtidas medidas do perímetro (µm) e área (µm2) dos hepatócitos, perímetro (µm), área (µm2), diâmetro maior e menor (µm) do núcleo de 10 hepatócitos por imagem (n=2.000). Adicionalmente, foram obtidas a relação área do núcleo/citoplasma (Ranc=área do núcleo/área do citoplasma x 100); volume nuclear do hepatócito (µm3) com a fórmula (4/3 x π.r3), onde r é o raio do diâmetro nuclear; o volume do hepatócito foi calculado pela fórmula (VHep= (AHep .VNuc) / ANuc), onde AHep = área do hepatócito (µm2); VNuc = volume nuclear (µm3) e ANuc = área nuclear (µm2). As brânquias foram retiradas, fixadas, incluídas em resina e cortadas para a confecção de lâminas histológicas, seguindo o mesmo protocolo, equipamentos e produtos descritos acima para o fígado. Em seguida foram fotodocumentadas 5 secções histológicas por indivíduo com uso de câmera digital (Leica DF495) acoplado ao microscópico (Leica DM 4000B). Para cada secção histológica foram aferidas a espessura do epitélio branquial (µm) em 10 locais distintos (n=1000), utilizando o software *Image Pro-Plus* 6.0. Para as análises estatísticas foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk, transformação logarítmica dos dados, seguido da verificação da homocedasticidade através do teste de Levene. Utilizamos a análise de variância ANOVA-one-way com nível de significância p≤0,05.

Resultados e Discussão

Na estrutura hepática dos girinos de *L. catesbeianus*, observamos sinusóides (capilares) envoltos por arranjos tubulares de hepatócitos, como já descrito para a espécie por Franco-Belussi et al. (2021). Para outras espécies de anuros, no entanto, como *Eupemphix nattereri*, o arranjo dos hepatócitos é descrito como cordonal duplo (Franco-Belussi et al., 2012), padrão também observado nas espécies: *Leptodactylus podicipinus, Lysapsus limellum, Pseudis platensis, e Trachycephalus typhonius* (Leão et al., 2021). Os hepatócitos têm forma poliédrica com núcleo basal e vasos sanguíneos espalhados pelo tecido hepático. Além disso, não se observa a organização lobular do estroma hepático, como descrito para mamíferos (Junqueira; Carneiro, 2013). Células contendo melanina, os melanomacrófagos, estão presentes no fígado dos girinos de *L. catesbeianus*. Essas células são comuns em órgãos hematopoiéticos de vertebrados ectotérmicos, e contêm em seu citoplasma, além da melanina, hemosiderina e lipofuscina, sendo responsáveis pela fagocitose de eritrócitos, eliminação de radicais livres, defesa contra agentes infecciosos e xenobióticos (Franco-Belussi et al, 2012). Os hepatócitos dos girinos de *L. catesbeianus* expostos por 96 horas a 10 ml/l do composto líquido à base de *B. bassiana* apresentaram as medidas de: área, volume, área do núcleo, relação núcleo-citoplasma e volume do núcleo, maiores quando comparados com o grupo controle (fig. 1). De forma semelhante, aqueles expostos, separadamente, pela mesma duração e à mesma concentração, ao composto líquido à base de *M. anisopliae*, comparados ao controle, também apresentaram aumento nesses parâmetros (fig. 2), com exceção da área do hepatócito, que não se alterou significativamente.

B. bassiana	Área Hepatócito (µm²)	Volume Hepatócito (µm³)	Area nuclear (µm²)	RNC	Volume nuclear (µm³)
C0 (0 ml/L)	291,12 ± 82,50	1758,19 ± 605,85	66,84 ± 16,39	4,54 ± 0,57	412,82 ± 164,17
C1 (10m/L)	326,86 ± 116,94	2130,06 ± 934,34	69,69 ±16,54	4,72 ± 0,56	459,91 ± 181,37

FIGURA 1- Valores médios e desvio padrão para as medidas morfométricas de hepatócitos de girinos de *L. catesbeianus* expostos a 10 ml/l (C1) do bioproduto contendo *B. bassiana* e do controle (C0).

M. anisopliae	Área Hepatócito (µm²)	Volume Hepatócito (µm³)	Area nuclear (µm²)	RNC	Volume nuclear (µm³)
C0 (0 ml/L)	458,77±177,43	2.534.85±1.135,96	56,67±12,51	4,17±0,48	317,65±117,30
C1 (10m/L)	447,15±4,57	2.677,75±953,76	65,61±14,37	4,51±0,51	399,29±140,60

FIGURA 2- Valores médios e de desvio padrão para as medidas morfométricas aferidas dos hepatócitos dos girinos de *L. catesbeianus* expostos a 10 ml/l (C1) do bioproduto à base de *M. anisopliae* e do grupo controle (C0).

O fígado, maior glândula dos vertebrados, é um órgão de importante função metabólica, onde os nutrientes provenientes da alimentação são processados e armazenados para o uso de outras partes do corpo, atuando, além disso, na síntese de proteínas, produção de bile e desintoxicação (Akiyoshi; Inoue, 2012). No presente trabalho, tanto os girinos expostos a 10 ml/l do composto à base de *B. bassiana* (IBCB 170), quanto aqueles expostos a mesma concentração do composto à base de *M. anisopliae* (IBCB 383), por 96 horas, apresentaram um aumento de medidas ligadas aos hepatócitos como volume, área do núcleo, volume do núcleo e relação núcleo-citoplasma quando comparados ao controle. Em trabalho anterior usando o mesmo animal modelo e mesmos produtos, Lopes et al. (2024) calcularam a CL50 dos bioprodutos, evidenciando ausência de toxicidade e de alterações genotóxicas e comportamentais. Tendo isso em vista, e levando em consideração a utilização de uma superdosagem para ambos os compostos (10 ml/L), as alterações morfométricas nos hepatócitos podem estar relacionados à função de metabolização desses compostos promovida pelo órgão, podendo refletir apenas uma tentativa do fígado desses animais de processar o excesso de solutos presentes no meio. Em anuros em estágio larval, os órgãos utilizados para respiração variam de espécie para espécie e de acordo com o estágio de desenvolvimento (Nokhbatolfoghahai; Downie, 2008). No caso da rã-touro, por exemplo a pele, as brânquias e os pulmões são utilizados para respiração mesmo antes da metamorfose. A estrutura observada para as brânquias de girinos de *L. catesbeianus* por volta do estágio 26 (Gosner) é condizente com a descrição realizada por Santos et al (2021), com os filamentos branquiais abundantemente ramificados, com ramificações semelhantes a dedos. Em relação, aos aspectos histológicos, foram identificados os filamentos branquiais (compostos por tecido conjuntivo colágeno, apresentando capilares espalhados por sua extensão), envoltos por tecido epitelial simples pavimentoso e suportadas por estruturas cartilaginosas.

Por serem sensíveis e estarem em constante contato com substâncias presentes no meio aquático, as brânquias de peixes são biomarcadores utilizados em trabalhos que visem avaliar a contaminação ambiental (Yancheva et al., 2016), de uma forma análoga, as brânquias de girinos também podem ser utilizadas para esse fim. Em estudo com larvas *L. catesbeianus*, Santos e companhia (2021) relataram diversas alterações branquiais, como hiperplasia das células epiteliais, congestão venosa, reações inflamatórias e necrose celular após exposição crônica à formaldeído. Também testando formaldeído, Bueno-Guimarães et al. (2001) observaram hiperplasia das células epiteliais de girinos de rã-touro expostos por 96 horas, destacando a análise do epitélio branquial de rã-touro como um marcador de poluição ambiental. No atual trabalho, os girinos de rã-touro expostos à 10 ml/L do composto à base *B. bassiana* e do composto à base de *M. anisopliae* por 96 horas apresentaram um aumento significativo na espessura do epitélio branquial, quando comparados com os girinos dos respectivos grupos controles (fig. 3).

Espessura do Epitélio Branquial (µm)		
Tratamento	*B. bassiana*	*M. anisopliae*
C0 (0 ml/L)	20,42±7,14	18,23±7,26
C1 (10 ml/L)	26,63±10,14	23,05±10,26

FIGURA 3- Valores médios e de desvio padrão para as medidas de espessura de epitélio branquial de *L. catesbeianus* expostos a 10 ml/l (C1) do bioproduto à base de *M. anisopliae* e, separadamente, à base de *B. bassiana* e dos grupos controles (C0).

Essa alteração consiste, provavelmente, em uma resposta ao ambiente com alta concentração dos bioprodutos testados, evitando a absorção em excesso desses compostos xenobióticos pelo epitélio respiratório, levando a uma menor eficiência nas trocas gasosas.

Conclusões

O estudo caracterizou o fígado, observando arranjo tubular de hepatócitos envoltos por sinusóides, além de melanomacrófagos espalhados pelo estroma hepático, e as brânquias de larvas de *L. catesbeianus*, com lamelas altamente ramificadas compostas por tecido conjuntivo colágeno, sustentadas por tecido cartilaginoso e revestidas por células pavimentosas. Os bioprodutos à base de *B. bassiana* e *M. anisopliae* alteraram parâmetros morfométricos hepáticos e causou um aumento da espessura do epitélio branquial, possivelmente devido à superdosagem utilizada e não pelo efeito tóxico do composto. Entretanto, são necessários mais trabalhos que avaliem os impactos subletais desses biopesticidas em vertebrados aquáticos.

Agradecimentos

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado, especialmente aos servidores técnicos de laboratório, ao IFSP Barretos e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - PIBITI - CNPq - Edital 10/2024.

Referências Bibliográficas

AGENDA 2030. (2015). ODS – **Objetivos de desenvolvimento sustentável**. Disponível em: http://www.agenda2030.com.br/. Acesso em: 10 jan. 2024.

AKIYOSHI, Hideo; INOUE, Asuka M. Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers. **Comparative Hepatology**, v. 11, n. 1, p. 2, 2012.

BUENO-GUIMARÃES, H. M. et al. Tadpole Epithelium Test: Potential Use of Rana catesbeiana Histopathologic Epithelial Changes to Evaluate Aquatic Pollution. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 67, n. 2, 2001.

FRANCO-BELUSSI, Llian et al. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 266, p. 129014, 2021.

FRANCO-BELUSSI, Lilian et al. Liver anatomy, histochemistry, and ultrastructure of Eupemphix nattereri (Anura: Leiuperidae) during the breeding season. **Zoological science**, v. 29, n. 12, p. 844 848, 2012.

GRAÇAS, J. P. RIBEIRO, C., COELHO, F. A. A., CARVALHO, M. E. A., CASTRO, P. R. de C. e., **Microrganismos estimulantes na agricultura**, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Série Produtor Rural, No 59, Piracicaba, 2015.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica.** In: Histologia básica. 2013. p. 512-512.

LEAO, Taynara et al. Comparative liver morphology associated with the hepatosomatic index in five Neotropical anuran species. **The Anatomical Record**, v. 304, n. 4, p. 860-871, 2021.

LOPES, Gabriel Henrique et al. **Efeitos dos compostos à base dos fungos entomopatogênicos Beauveria bassiana (IBCB 170) e Metarrizhium anisopliae (IBCB 383) em larvas de Lithobates catesbeianus (SHAW, 1802)**. In: Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP. 2024.

NOKHBATOLFOGHAHAI, M.; DOWNIE, J. R. The external gills of anuran amphibians: comparative morphology and ultrastructure. **Journal of Morphology**, v. 269, n. 10, p. 1197-1213, 2008.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). **Technical Overview of Ecological Risk Assessment**. Novembro de 2024 (atualizado mês passado). Disponível em: https://www.epa.gov/pesticide-science and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0. Acesso em: 3 ago. 2025.

REHNER SA, BUCKLEY E, A. Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. Mycologia 97:84–98 (2005)

ROBERTS DW, ST LEGER RJ, Metarhizium spp., cosmopolitan insectpathogenic fungi: mycological aspects, in Advances in Applied Microbiology, ed. by Laskin AI, Bennet JW and Gadd GM. **Elsevier Academic Press** Inc, Cambridge, MA, pp. 1-70. 2004.

SANTOS, Diego Sales et al. Histopathological changes in the gills of zebrafish (Danio rerio) and bullfrog tadpoles (Lithobates catesbeianus) caused by the use of formaldehyde. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3832-3847, 2021.

YANCHEVA, Vesela et al. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **Applied ecology and environmental research**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.