

ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E MORFOFISIOLÓGICO HEPÁTICO EM TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA COM BIOINSETICIDA A BASE DE *Bacillus thuringiensis*

*CHANGES IN BLOOD PARAMETERS AND LIVER MORPHOPHYSIOLOGY IN NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus*, AFTER ACUTE EXPOSURE WITH *Bacillus thuringiensis*-BASED BIOINSECTICIDE*

*CAMBIOS EN PARÁMETROS SANGUÍNEOS Y MORFOFISIOLOGÍA HEPÁTICA EN TILAPIA DEL NILO, *Oreochromis niloticus*, DESPUÉS DE EXPOSICIÓN AGUDA A BIOINSECTICIDAS A BASE DE *Bacillus thuringiensis**

Ducilene do Carmo da Silva^{*1}, Ericsson Rubens Rodrigues Ferreira¹, Sandro Estevan Moron¹, Wagner dos Santos Mariano², Marcelo Gustavo Paulino²

¹Centro de Ciências Agrárias, Unidade EMVZ, Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína/TO, Brasil.

²Centro de Ciências Integradas, Unidade Cimba, Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína/TO, Brasil.

Aprovado em 12/2023 publicado em 29/12/2023.

RESUMO

Os biopesticidas visam substituir pesticidas sintéticos, sendo que, os formulados a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) os mais empregados nas lavouras. Todavia, é pouco conhecido o seu mecanismo de ação e efeitos sob a biota aquática. O objetivo foi avaliar os efeitos subletais do Bt em tilápia-do-Nilo após exposição aguda. Os peixes foram divididos em um grupo controle (GC), um exposto à 30 mg L⁻¹ do biopesticida (G30) e um exposto a 40 mg L⁻¹ do Bt (G40), por 48 horas. Após exposição, amostras de sangue e fígado foram coletadas para análise de toxicidade. O número de eritrócitos com núcleos lobulados e reniformes aumentou, mas sem observância de micronúcleos. Não houve alteração nos parâmetros eritrocitários, todavia, o número de leucócitos totais e trombócitos aumentou nos tratados. Alterações histopatológicas hepáticas foram evidenciadas por um aumento de inclusões intracelulares, alteração nucleares e diminuição de hepatócitos hipertrofiados entre os tratados. O I_{org} demonstrou comprometimento do tecido hepático no grupo G30 em relação ao controle e entre tratados. Os danos resultantes da exposição ao Bt podem ser severos, mesmo sendo categorizados como reversíveis. Concentrações baixas de Bt podem induzir efeitos deletérios para peixes, interferir no sistema imune e citológico do sangue e fígado.

Palavras-chave: Biopesticida, microrganismo, contaminação aquática, teleósteo, histopatologia.

ABSTRACT

Biopesticides aim to replace synthetic pesticides, and those formulated based on *Bacillus thuringiensis* (Bt) are the most used in crops. However, little is known about its mechanism of action and effects on the aquatic biota. The objective was to evaluate the sublethal effects of Bt in Nile tilapia after acute exposure. The fish were divided into a control group (GC), one exposed to 30 mg L⁻¹ of the biopesticide (G30) and one exposed to 40 mg L⁻¹ of Bt (G40), for 48 hours. After exposure, blood and liver samples were collected for toxicity analysis. The number of erythrocytes with lobulated and kidney-shaped nuclei increased, but without observing micronuclei. There was no alteration in the erythrocyte parameters, however, the number of total leukocytes and thrombocytes increased in the treated ones. Hepatic histopathological changes were evidenced by an increase in intracellular inclusions, nuclear alterations and a decrease in hypertrophied hepatocytes among those treated. The I_{org} demonstrated impairment of the hepatic tissue in the G30 group in relation to the control and among the treated. Damage resulting from exposure to Bt can be severe, even though it is categorized as reversible. Low concentrations of Bt can induce deleterious effects for fish, interfere with the immune and cytological systems of the blood and liver.

Keywords: Biopesticide, microorganism, aquatic contamination, teleost, histopathology.

RESUMEN

Los bioplaguicidas pretenden sustituir a los plaguicidas sintéticos, siendo los formulados a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) los más utilizados en los cultivos. Sin embargo, se sabe poco sobre su mecanismo de acción y efectos sobre la biota acuática. El objetivo fue evaluar los efectos subletales de Bt en tilapia del Nilo después de una exposición aguda. Los peces se dividieron en un grupo control (GC), uno expuesto a 30 mg L⁻¹ del biopesticida (G30) y otro expuesto a 40 mg L⁻¹ de Bt (G40), durante 48 horas. Después de la exposición, se recolectaron muestras de sangre e hígado para análisis de toxicidad. Aumentó el número de eritrocitos con núcleos lobulados y en forma de riñón, pero sin observar micronúcleos. No hubo alteración en los parámetros eritrocíticos, sin embargo, el número de leucocitos totales y de trombocitos aumentó en los tratados. Los cambios histopatológicos hepáticos se evidenciaron por un aumento de inclusiones intracelulares, alteraciones nucleares y una disminución de hepatocitos hipertrofiados entre los tratados. El I_{org} demostró deterioro del tejido hepático en el grupo G30 en relación con el control y entre los tratados. El daño resultante de la exposición al Bt puede ser grave, aunque se clasifica como reversible. Las bajas concentraciones de Bt pueden inducir efectos nocivos para los peces, interferir con los sistemas inmunológico y citológico de la sangre y el hígado.

Descriptores: Biopesticida, microorganismo, contaminación acuática, teleosteos, histopatología.

INTRODUÇÃO

A agricultura fornece resíduos de produtos químicos que podem ser distribuídos aos ecossistemas e, quando disponíveis em ambientes aquáticos, podem contaminar os corpos d'água e viveiros de aquicultura (GALINDO REYES et al., 2000; COMOGLIO et al., 2005). Diante do uso intensivo e desordenado nos cultivos agrícolas, os pesticidas se tornaram uma das classes de contaminantes com maior representatividade no ambiente, gerando diversos impactos ambientais,

principalmente nos recursos hídricos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Conseqüentemente, essas substâncias podem interagir com a biota aquática e causar alterações genotóxicas, morfofuncionais ou até morte a esses animais (DEVI; MISHRA, 2013; MORAES et al., 2015).

Embora os pesticidas sejam intensamente utilizados para o controle de pragas, apresentam desvantagens que são relevantes para as populações de animais selvagens, ou seja, estão longe de serem específicos da espécie e, portanto, afetam negativamente organismos não-alvo (NAKAGOME; NOLDIN; RESGALLA JR, 2007; NOCELLI et al., 2012; SCHIEHL et al., 2019). Neste contexto, objetivando alternativas menos prejudiciais ao meio ambiente, há em protagonismo o uso de biopesticidas, os quais possuem agentes de biocontrole como naturais ou substâncias derivadas de seres vivos, incluindo seus genes e/ou metabólitos (FERREIRA et al., 2022). Sendo assim, a utilização de biopesticidas sugere ser inerente e fundamental para o sucesso da disponibilidade de alimentos para o homem e animais (SUDAKIN, 2003). Muitos pesticidas microbiológicos, tais como formulações contendo o *Bacillus thuringiensis* (Bt) como princípio ativo, tem a característica de ser um inseticida biológico danoso apenas contra organismos alvos, como larvas de lepidópteros (MACEDO et al., 2012).

O Bt é uma bactéria gram-positiva e aeróbia, que produz inclusões proteicas cristalinas e esporos, sendo estas inclusões compostas por proteínas como β -endotoxinas ou proteínas *Cry*, muito tóxicas a uma grande variedade de insetos, como lepidópteros, dípteros e coleópteros (MACEDO et al., 2012; MARTINS et al., 2014), além de ser útil para controle de animais não-alvos, pois há subespécie de *B. thuringiensis* que apresenta cristais tóxicos contra insetos das Ordens Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthraptera, bem como para alguns nematoides, protozoários e ácaros (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992; FEDERICI, 2005). O Bt é muito utilizado na agricultura, em plantações transgênicas, pois as proteínas *Cry* são expressas em todas as células da planta, de modo a expor continuamente as larvas dos insetos à proteína tóxica (NAVON, 2000; SANCHIS; BOURGUET, 2008).

Entretanto, alguns estudos demonstraram o Bt como não nocivo à peixes. Simão et al. (2021) analisou a genotoxicidade, mutagenicidade e morfologia em *O. niloticus* e, observou uma não toxicidade do biopesticida. Silva et al. (2020) observou que o Bt não alterou as variáveis hematológicas nesta mesma espécie, demonstrando uma baixa toxicidade do químico. Em contrapartida, Mariano et al. (2019) demonstrou efeitos nocivos do Bt em *Arapaima gigas* e *Piaractus mesopotamicus* expostos a 20 mg L⁻¹. Esses dados tornam-se relevantes às informações de que o Bt poderia alterar a saúde dos peixes e equilíbrio do ecossistema aquático.

Considerando que os efeitos do Bt são pobremente estudados em espécies de peixes neotropicais e, que não existe uma relação espécie-específica com os efeitos já analisados, o objetivo

deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos que concentrações subletais de Bt em água podem causar em peixes *Oreochromis niloticus* após exposição aguda ao biopesticida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Juvenis de *O. niloticus* (Comprimento total = $13,19 \pm 1,19$ cm e massa corpórea = $44,8 \pm 14,5$ g) foram obtidos de uma piscicultura comercial localizada em Araguaína -TO. Os peixes foram transportados para o Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada (LaMAC) da Universidade Federal do Tocantins, Campus Cimba, acomodadas em tanques de 250 L com aeração constante, temperatura (27 ± 1 ° C) e parâmetros físico-químicos (pH 6,5; OD $6,2 \pm 2,3$) controlados e ciclo natural claro:escuro (12:12 h). Os animais eram alimentados *ad libitum* uma vez ao dia com ração comercial com 40% de proteína.

Biopesticida

O biopesticida utilizado foi o Dipel® WP que tem como princípio ativo esporos da bactéria *B. thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1, 16.000 UI de potência por mg (mínimo de 25 bilhões de esporos viáveis por grama) na concentração de 32,0 g de Bt Kg⁻¹ de Dipel (3,2 % m/m). O produto é registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o n° 00858901 (MAPA, 2017).

Delineamento experimental e coleta de amostras

Os peixes foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=8 cada grupo), sendo um controle (GC), um grupo exposto à 30 mg L⁻¹ do biopesticida (G30) e grupo exposto a 40 mg L⁻¹ do biopesticida (G40). Os animais foram colocados em aquários de 100 L com os parâmetros físico-químicos controlados como na aclimação, privados de alimentação para aclimação por 24 horas. A exposição foi por 48 horas em sistema estático.

Após a exposição, os animais foram preparados para os procedimentos da coleta de amostras de sangue (1 mL) via punção caudal com seringas heparinizadas para os parâmetros hematológicos e genotóxicos. Em seguida, foram anestesiados e eutanasiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) e secção medular para coleta do fígado para análise de biomarcador histopatológico.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins, processo número 23.101.002.470/2020-17.

Biomarcadores citogenotóxicos

Uma alíquota (10 µL) de sangue total foi utilizada para confecção de extensão sanguínea em lâminas histológica, as quais foram secas em temperatura ambiente, fixadas em metanol por 20

minutos e coradas com Guemsa 5% por 20 min. Após secas, as lâminas foram utilizadas para o teste do micronúcleo (MN) e ocorrências de alterações eritrocíticas nucleares (ANEs) segundo metodologia de Carrasco et al. (1990), com adaptações de Cavalcante et al. (2008).

As análises foram realizadas em microscópio de luz (PHYSIS), sob aumento de 1000x. Para cada animal, foram analisados 3.000 eritrócitos, anotando as frequências das alterações nucleares e MN das células. Para a consideração de um MN verdadeiro, as análises seguem um critério característico: 1) ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal; 2) ter um diâmetro de até 1/3 do diâmetro do núcleo principal; 3) não ser refringente; 4) não estar de qualquer forma conectado ao núcleo principal; 5) possuir a mesma coloração do núcleo principal. Para a classificação das ANEs foram consideradas características morfológicas como: núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo reniforme, núcleo vacuolado, núcleo indentado e binucleado.

Biomarcadores fisiológicos

As amostras sanguíneas foram utilizadas para determinação do hematócrito (Hct - %), concentração de hemoglobina (Hb – g dL⁻¹), eritrócitos (RBC – número de células x 10⁴ mm³ de sangue), Volume Corpuscular Médio (VCM – fL), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM – pg célula⁻¹) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM – g dL⁻¹). Extensões sanguíneas foram preparadas com o kit Panótico rápido (Laborclin) e utilizadas para a contagem de leucócitos totais e trombócitos totais. A análise diferencial de leucócitos foi calculada pelo número de eritrócitos (em 2.000 células), segundo a metodologia de Sadauskas-Henrique et al. (2011).

Biomarcadores morfológicos

Amostras fígado foram coletadas e fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Sub-amostras de fígado foram desidratadas em uma série de concentrações crescentes de etanol (de 70% a 100%), diafanizadas em xilol e embebidas em parafina histológica. Secções histológicas do tecido foram confeccionadas em 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Em cada lâmina, foram examinadas quatro secções histológicas, com 5 campos aleatórios por secção (20 campos amostrais totais) utilizando um microscópio de luz (LEICA MD500) juntamente com uma câmera de vídeo e um software de análise de imagem (LAS 2.0) em aumento de 400x.

A classificação histopatológica foi baseada em um escore (Sc) numérico e um fator de importância (Fi), que indica a gravidade e a frequência da lesão, segundo metodologia de Paulino et al. (2020). A classificação do Sc baseia-se na distribuição das lesões no órgão baseados na presença de lesões nos campos amostrais: (1) ausência de lesão; (2) lesão raramente presente; (3) pouco frequente; (4) moderadamente frequente; (5) lesão amplamente frequente. O Fi indica a gravidade da lesão e o efeito na sobrevivência dos animais e é classificada: (1) indica lesão reversível de baixa importância

patológica; (2) lesão reversível se há remoção do estressor, e então, de importância patológica moderada; (3) lesão irreversível, sendo de alta importância patológica.

O índice de lesão individual de lesão (I_{alt}) foi determinado a partir da multiplicação do Sc e Fi, enquanto o índice de comprometimento morfofuncional do órgão (Iorg) foi determinado a partir da soma dos Ialt para cada animal ($I_{org} = \sum I_{alt}$).

Análise estatística

Os dados foram representados pela média \pm EPM (erro padrão da média). Os resultados obtidos entre os grupos experimentais e controles foram comparados entre si por meio de análise de variância – critério único (ANOVA – Kruskal-Wallis), seguida de pós-teste de Dunns com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Alterações nucleares eritrocitárias e teste do micronúcleo

Após exposição, houve um aumento de eritrócitos com núcleos lobulados e reniforme, entretanto, não foi observada a presença de MN em animais dos grupos testes (Tabela 1). Houve variação no grupo G30 e G40 para núcleo lobulado e reniforme em relação ao controle, no entanto, não demonstrou estatisticamente uma resposta dose-dependente entre os grupos tratados com o biopesticida DIPEL®.

Tabela 1. Média (\pm EPM) da avaliação genotóxica dos efeitos do DIPEL® WP em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* após 48 horas de exposição a 30mg L⁻¹ e 40mg L⁻¹

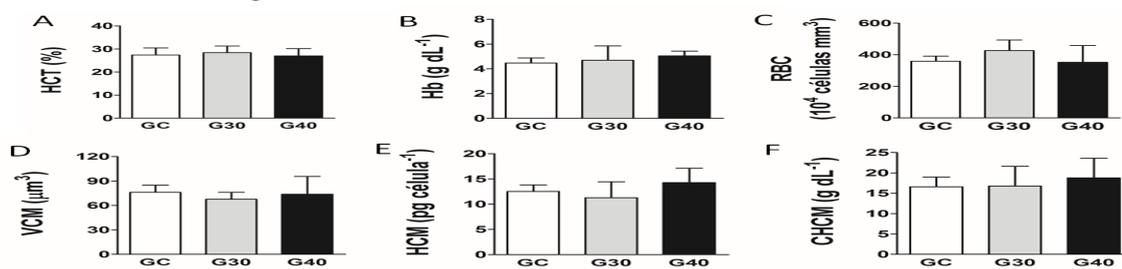
Alterações nucleares e avaliação genotóxica			
Alterações	GC	G30	G40
Micronúcleo	0,7 \pm 0,5	0	0
Núcleo segmentado	13,5 \pm 2,6	36,6 \pm 10,4	39,8 \pm 10,4
Núcleo lobulado	22,1 \pm 3,2	74,3 \pm 20,0*	88,2 \pm 6,4*
Núcleo reniforme	12,6 \pm 2,4	37,7 \pm 8,1*	39,8 \pm 5,6*
Núcleo vacuolado	0,12 \pm 0,1	0	0
Núcleo binucleado	0	0	0

(*) indica diferenças estatísticas ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle.

Parâmetros hematológicos

A exposição de *O. niloticus* ao biopesticida Dipel® WP não causou alterações nos parâmetros eritrocitários (Hct, RBC, VCM, HCM, CHCM) nas concentrações testadas neste estudo (Figura 1).

Figura 1: Parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus* expostos ao biopesticida Dipel® WP a base de *Bacillus thuringiensis*.



O número total de leucócitos aumentou em ambos os grupos tratados em relação ao controle, todavia, não apresentou uma resposta dose-dependente quando comparados entre si. Para os animais expostos ao grupo G40, houve um aumento de 124% no número total de trombócitos em relação ao controle. Ainda neste grupo, houve uma diminuição na porcentagem de linfócitos e, a porcentagem de neutrófilos e eosinófilos aumentou neste grupo após as 48 horas (Tabela 2).

Tabela 2. Trombograma e leucograma de *Oreochromis niloticus* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

Variáveis	GC	G30	G40
Número de leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	24,8 ± 1,8	81,2 ± 6,0*	85,7 ± 12,2*
Número de trombócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	13,8 ± 1,9	26,5 ± 4,8	29,2 ± 4,7*
Linfócitos (%)	49,8 ± 2,2	45,1 ± 2,9	32,5 ± 1,9*#
Neutrófilos (%)	36,0 ± 2,3	43,8 ± 2,8	49,5 ± 1,9*
Eosinófilos (%)	1,6 ± 0,6	2,2 ± 0,7	5,6 ± 1,2*#
Monócitos (%)	11,5 ± 1,2	6,9 ± 0,9	10,3 ± 1,8
Basófilos (%)	0	0	0
LG-PAS (%)	1,0 ± 0,4	0,7 ± 0,4	2,0 ± 0,8

Valores expressam média ± desvio padrão. LG-PAS = leucócitos granulares PAS-positivo. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os controles. (#) indica diferença entre os grupos expostos.

Análises histopatológica

Após a exposição aguda por 48 horas com o biopesticida à base de Bt, houve aumento de alteração na arquitetura hepática com consequente desorganização na estrutura dos hepatócitos dos animais expostos. Nas alterações histopatológicas individuais (I_{alt}), houve diferenças das alterações nucleares no G30 em relação ao controle e, diferença entre os grupos tratados, sendo que G40 apresentou acúmulo de substâncias intracelulares, alterações nucleares e hipertrofia dos hepatócitos inferiores ao G30 (Tabela 3).

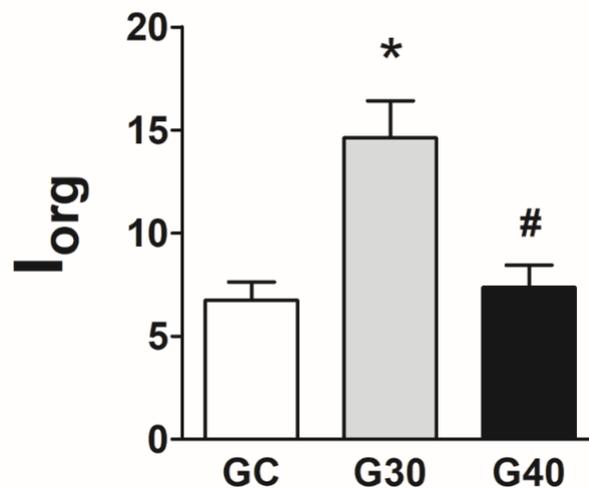
Tabela 3: Índice de lesão histopatológica (I_{alt}) médio em fígado de *Oreochromis niloticus* expostas a 40 mg L⁻¹ do biopesticida Dipel® à base de *Bacillus thuringiensis*.

Índice individual de alteração histopatológica (I_{alt})				
Alterações	Fi	GC	G30	G40
Acúmulos de substâncias intracelulares	1	3,1 ± 0,5	4,0 ± 0,0	2,5 ± 0,6#
Alteração da arquitetura hepática e estrutura celular	1	0	0	0,8 ± 0,5

Alterações nucleares	2	0,2 ± 0,2	4,7 ± 1,1*	0,2 ± 0,2 [#]
Atrofia celular	2	0	0,7 ± 0,5	1,0 ± 0,5
Degeneração citoplasmática	1	2,5 ± 0,6	2,2 ± 0,5	2,0 ± 0,7
Hipertrofia dos hepatócitos	1	0,9 ± 0,3	2,9 ± 0,5	0,7 ± 0,3 [#]

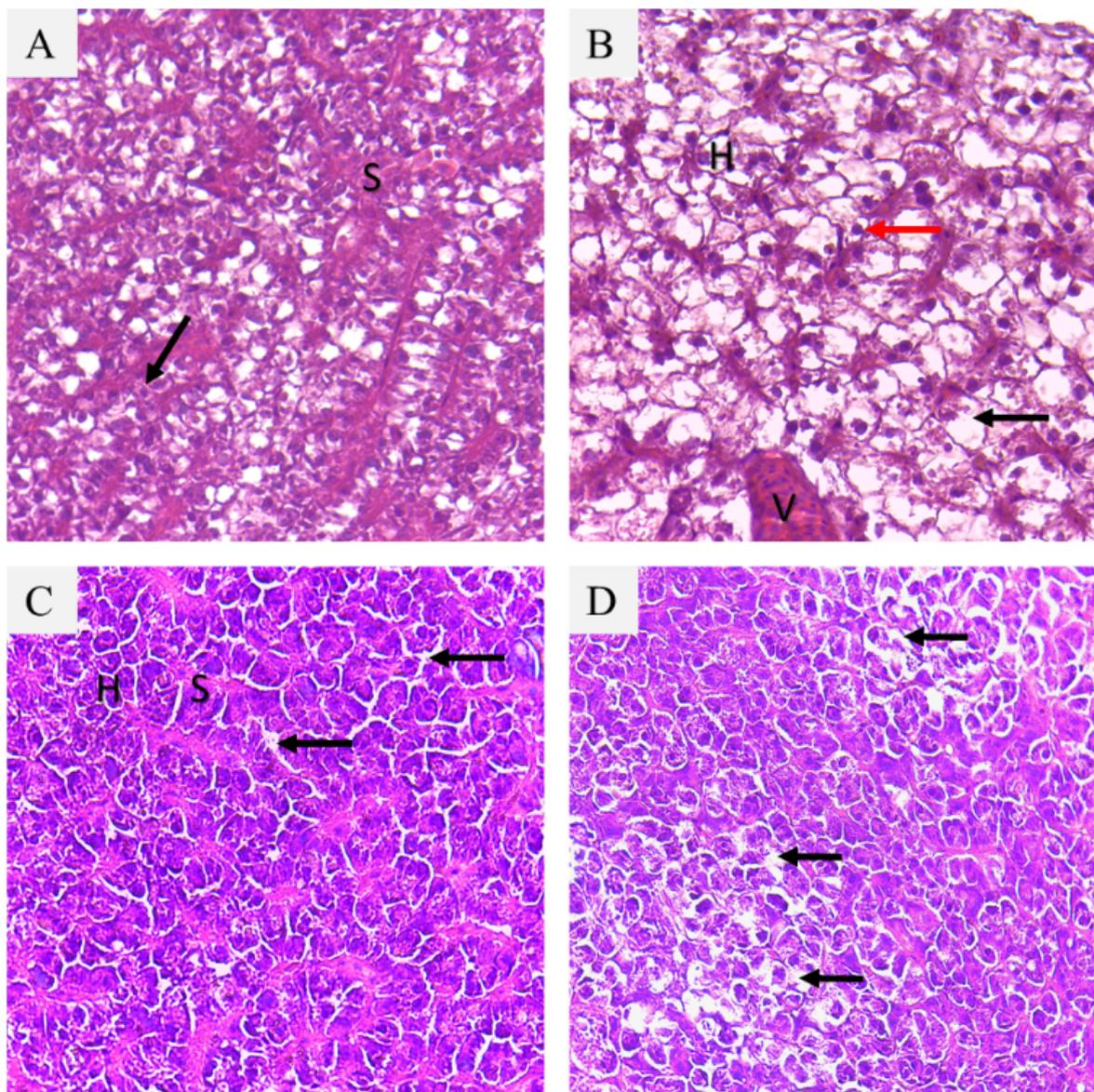
O I_{org} demonstrou que houve comprometimento do tecido hepático no grupo G30 em relação ao controle e, diferença significativa entre os grupos tratados, todavia, não houve alteração entre o grupo G40 e controle (Figura 2).

Figura 2 - Índice de lesão do órgão (I_{org}) em fígado de tilápia (*Oreochromis niloticus*) expostos a diferentes concentrações do biopesticida Dipel por 48 h.



As principais alterações histopatológicas encontradas em fígado de tilápia-do-Nilo estão representadas na Figura 3. Após exposição foi evidente a retração dos hepatócitos e aumento dos espaços intercelulares.

Figura 3 - Alterações histopatológicas do fígado de *Oreochromis niloticus* após 48h de exposição ao biopesticida Dipel® WP à base de *Bacillus thuringiensis*. (A) Representação do tecido sem alterações de animais do grupo controle. Seta indica um hepatócito com morfologia característica: núcleo centralizado, formato poliédrico e aderentes a outros hepatócitos; (B) Setas pretas indicam presença de degeneração citoplasmática e setas vermelhas, presença de núcleos na periferia da célula. Em (C e D) setas indicam aumento do espaço intercelular entre hepatócitos, caracterizados pela retração celular. S = sinusóides; H = hepatócitos; V = vasos. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento = 400x.



DISCUSSÃO

Estudos utilizando peixes como bioindicadores da toxicidade do biopesticida a base de Bt estão cada vez mais recorrentes, no qual já evidenciaram a toxicidade do Bt nestes organismos não-alvos, apontando alterações nos parâmetros hematológicos e sistema imune inato (MARIANO, 2017). Nesta perspectiva, sugere-se a possibilidade de que os esporos de *Bacillus thuringiensis* sejam captados via brânquia por mecanismos de transporte da membrana de células epiteliais e distribuídos na circulação sistêmica. Neste estudo, foi notório as alterações nos parâmetros hematológicos e hepático em tilápia-do-Nilo após exposição aguda de 48 horas.

A utilização de análises hematológicas em peixes expostos a xenobióticos, são consideradas fundamentais em estudo de monitoramento ambiental (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Neste estudo, não houve alteração nos parâmetros eritrocitários, sendo indicativo que a exposição aguda ao Bt não induziu quadros patológicos como anemias ou disfunção de transporte de gases. A análise dos parâmetros hematológicos possibilita uma rápida detecção das características fisiológicas e patológicas em peixes, indicando possíveis distúrbios metabólicos ocorridos (DRUMOND et al., 2010; MARIANO et al., 2009). Entretanto, pôde ser observado a ativação do sistema imune pelo aumento dos leucócitos totais. Os leucócitos desempenham papel na atividade dos processos inflamatório e imunológico, e o aumento em seu número total indica uma resposta rápida contra a defesa do sistema imunológico do organismo (CRUVINEL et al., 2010; SARAN NETO; MARIANO; SÓRIA, 2009; SILVA; LIMA; BLANCO, 2012).

Os neutrófilos são células de defesa relacionadas em processos inflamatórios causados por substâncias exógenas que adentram o organismo (SANTOS, 2015; PAIXÃO et al., 2017). Sugere-se que o aumento na contagem de neutrófilos no grupo G40, possa ter ocorrido devido a liberação de glicocorticoides que estimulam o influxo de neutrófilos no sangue para a medula óssea e atenua o egresso de neutrófilos do sangue para outros compartimentos. Sabendo que os eosinófilos possivelmente atuam na defesa contra infestações parasitárias (PÁDUA et al. 2010), sugere-se que tal aumento na alteração e dose resposta em G40 possa estar relacionado com o mecanismo de defesa do organismo para combater a bactéria *B. thuringiensis*. Adicionado a isso, mesmo com aumento dos leucócitos totais, podemos observar que houve uma diminuição de linfócitos para o grupo G40. Vivas (2016) ressalta que uma redução na contagem de linfócitos caracteriza-se como linfopenia, sendo extremamente comum como parte da resposta aguda ao estresse.

As alterações leucocitárias foram em sua maioria significativas em animais expostos ao G40, com considerável aumento quando comparados aos grupos controle e G30. Mariano (2017) analisando os efeitos tóxicos do Bt em peixes, via biomarcadores hematológicos, observou que as principais alterações encontradas são atribuídas ao aumento do número de leucócitos, representando um mecanismo de defesa dos organismos em resposta aos esporos da bactéria. Um aumento na produção de trombócitos pode indicar mecanismo de defesa imunológica do peixe em resposta a exposição ao contaminante (TAVARES-DIAS et al., 2007; TAVARES-DIAS et al., 2000). Após a exposição aguda ao Bt, houve um aumento na quantidade de trombócitos circulantes. Dado isto, sugere-se que o número de trombócitos aumentados nos animais expostos a maior concentração de Bt, pode ter ocorrido em resposta aos centros hematopoiéticos pela depreciação demonstrada por células fagocitárias, como os neutrófilos e monócitos (SILVA, et al., 1998; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Embora ausência de MN neste estudo, o trabalho de Grisolia et al. (2009) analisando a genotoxicidade de Bt em peixes-zebra (*Danio rerio*) observou que a exposição a endotoxina Cry1Aa, aumentou significativamente a frequência de MN. A ausência de MN pode estar associada ao período de exposição e/ou baixa concentração do biopesticida disperso na água, não resultando em qualquer efeito fisiopatológico, morfológico, genotóxico ou relacionados ao ciclo celular. Alterações nucleares eritrocitárias (ANEs) também foram observadas após exposição, e segundo Ventura et al. (2008) a presença de ANEs é indicativo de genotoxicidade causada pela exposição a substâncias tóxicas.

As lesões encontradas e distribuídas no tecido hepático de *O. niloticus* pode prejudicar a funcionalidade normal do órgão. Bonomo et al. (2021) ressaltam que o acúmulo de substâncias intracelular, por exemplo, sugere um processo degenerativo, associado a alterações na eliminação da bile, de uma forma que ela se acumule nos hepatócitos e não seja eliminada, por possível obstrução dos canalículos biliares. Destacam ainda, que as alterações nucleares podem afetar a função celular, uma vez que o material genético se localiza no núcleo e dele depende todas as funções da mesma. Após a exposição, houve redução na frequência de hepatócitos hipertrofiados para o grupo G40, em relação ao controle e G30. A hipertrofia dos hepatócitos indica aumento de atividade celular, podendo ocasionar perda da função metabólica, devido a possibilidade de degradação de proteínas, advindo da presença de alguma substância química (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Liebel et al. (2013) destacam que alterações no tecido hepático podem representar adaptações para manter as funções fisiológicas do organismo.

A perda da morfologia dos hepatócitos após a exposição à xenobióticos pode estar relacionada a alterações no citoesqueleto e dissociação das estruturas de especialização de membranas celulares (PAULINO et al., 2020). Esses resultados também foram observados por Mariano (2017) após exposição de *A. gigas* ao Bt. Alterações teciduais hepáticas em peixes expostos ao Bt ainda são escassos, entretanto, não pode desconsiderar que efeito nocivo possa ser diagnosticado a longo prazo. Neste estudo, a exposição ao Bt não causou lesões tissulares graves no fígado, no qual o índice de lesão do órgão demonstrou patologias de caráter progressivo com possibilidades de reversão quando livre do contaminante. Entretanto, essas lesões, mesmo de baixa importância patológica, pode levar a um desarranjo do parênquima hepático e retração nos sinusoides, ocorrendo riscos de hemorragia intra-hepática.

Não há evidências que formulações a base de Bt causem efeitos diretos aos hepatócitos, dessa forma, sugere-se que as alterações celulares em fígado de tilápia sejam consequência da toxicidade do Dipel®. Em pesticidas formulados é comum a inclusão de substâncias associadas para assegurar ou potencializar sua eficácia (ROMAN et al., 2007), de modo a sugerir que tais substâncias sejam capazes mimetizar (ou inibir) o efeito da bactéria no peixe. Ao longo do tempo de uma exposição, as mudanças

no tecido, vide alterações histopatológicas, vão se acumulando e refletindo um impacto gradual no metabolismo até a perda funcional total e comprometimento da sobrevivência do indivíduo (CHOVANEC et al., 2003).

A toxicidade do Bt demonstrou efeitos em fígado e no comprometimento morfofuncional, evidenciado pelo I_{org} , cujas lesões nos hepatócitos podem resultar em disfunção do órgão como um todo, causando graves consequências para o metabolismo. Segundo Hinton et al. (1992) a concentração de xenobióticos no fígado, a excreção destes e de seus metabolitos através da bile ou a conversão dessas substâncias nos hepatócitos, colaboram para a vulnerabilidade do órgão a injúrias químicas. Dado isto, sugere-se que os danos resultantes da exposição ao Bt podem ser severos, mesmos que não categorizados como irreversíveis.

CONCLUSÃO

As concentrações do biopesticida à base de *B. thuringiensis* testadas em exposição aguda, demonstrou toxicidade para espécie *O. niloticus*, uma vez que houve indução de alterações nos parâmetros citogenotóxicos, hematológicos e histopatológico analisados. Embora não tenha apresentado grandes alterações concentração-dependente entre os grupos tratados, o aumento na frequência de eritrócitos com núcleos lobulado e reniforme após exposição, podem ser indicativos de efeito citogenotóxicos não mutagênico. Devido ao aumento de trombócitos e leucócitos, o Bt revelou afetar o sistema imunológico do animal, como resposta rápida contra defesa. As alterações morfológicas identificadas no tecido hepático, sugerem que a tilápia responde ao biopesticida, para tentar se ajustar as condições impostas no seu ambiente. A utilização de Bt na lavoura ou diretamente na piscicultura, dentre concentrações não exacerbadas, podem demonstrar perigos à tilápia-do-Nilo mesmo em baixas concentrações, entretanto, são necessários estudos mais direcionados em investigar a toxicidade subcrônicas e crônica do Bt em *O. niloticus* para classificar os bioinseticidas como seguros á biota aquática.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao apoio técnico da UFNT, Msc. Liana Bezerra Dias de Lima, com o delineamento experimental e processamento de amostras.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

BEEGLE, C.C.; YAMAMOTO, T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can. Entomol.**, v.124, p.587-616, 1992.

Silva et al, 2023_ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E MORFOFISIOLÓGICO HEPÁTICO EM TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA COM BIOINSETICIDA A BASE DE Bacil

BONOMO, M.M.; SACHI, I.T.S.; PAULINO, M.G.; FERNANDES, J.B.; CARLOS, R.M.; FERNANDES, M.N. Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115758, 2021.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** v.47, p.2123-2136, 1990.

CAVALCANTE, D.G.S.M.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, n.655, p.41-46, 2008.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H.G. **Bioindicators and Biomonitoring**. Oxford: Elsevier Science, p. 639-671, 2003.

COMOGLIO, L.; AMIN, O.; ROQUE, A.; HARO, B.M. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. **Ecotox. and Environ**, v.62, p.66-74, 2005.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.

DEVI, Y.; MISHRA, A. Histopathological Alterations in gill and liver anatomy of fresh water, air breathing fish *Channa punctatus* after pesticide Hilban® (Chlorpyrifos) treatment. **Ad. Biores**, v.4, p.57-62, 2013.

DRUMOND, G. V. F.; CAIXEIRO, A. P. A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E.G Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Acta Amazonica**, v.40, n.3, p.591-595, 2010.

FEDERICI, B. A. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. **J. Invertebr. Pathol.** v.89, p.30-38, 2005.

FERREIRA, P.G.; HÜTHER, C.M.; CARVALHO, A.S.; FOREZI, L.S.M.; SILVA, F.C.; FERREIRA, V.F. Nicotina e a Origem dos Neonicotinoides: Problemas ou Soluções?. **Revista Virtual de Química**, v.14, n.3, 2022.

GALINDO-REYES, J.G.; DALLA-VENEZIA, L.; LAZCANO-ALVARES, G.; RIVASMENDOZA, H. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. **Chemosphere**, v.40, p.233-237, 2000.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, R.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONERAT, R.G.; SOARES, A.M. Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.672, n.2, p.119-123, 2009.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R.J.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE Jr, P.M.; BERGMAN, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. **Boca Raton: Lewis Publishers**, v.4, p.155 –196, 1992.

LIEBEL, S.; TOMOTAKE, M.E.M., RIBEIRO, C.A.O. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v.8, n.2, p.09 – 15, 2013.

LOPES, C.V.A.; ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

MACEDO, C.L.; MARTINS, E.S.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, A.C.; PRAÇA, L.B.; GÓIS, L.A.B.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesq. agropec. Bras.**, v.47, p.1759-1765, 2012.

MARIANO, W.S.; OLIVEIRA-LIMA, J.; SANTUCI, M.A.; LIMA, L.B.D.; MORON, S.E.; TAVARES-DIAS, M. Can a biopesticide based on *Bacillus thuringiensis* affect the physiology and histomorphology of *Arapaima gigas*?. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

MARIANO, W.S.; AZEVEDO, S.B.; GOMES, F.L.; LIMA, L.B.D.; MORON, S.R.; TAVARES-DIAS, M. Physiological parameters of *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) exposed to a biopesticide based on *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SANTOS L.R.B.; FERNANDES, W.S. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerthrinus unitaeniatus*) expostos ao ar atmosférico. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.1, p.210-223, 2009.

MARTINS, A.L.; VIVAN, R.H.F.; SANTOS, F.P. Caracterização Genética de Novos Isolados Bacterianos com Potencial Entomopatogênico. **Revista Terra & Cultura**, v.58, p.11-18, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Registros de Produtos Biológicos - AGROFIT** 78. pdf, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso: 23/01/2023.

MORAES, G.; MORAES, F.D.; VENTURINI, F.P.; ROSSI, P.A.; AVILEZ, I.M.; SOARES, C.A.P. O uso de piretroides na piscicultura: perspectivas e restrições. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Editora Pedro & João, São Carlos (SP), 345p. 2015.

NAKAGOME, F.K.; NOLDIN, J.A.; RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, 2007.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Prot.**, v.19, p.669-676, 2000.

NOCELLI, R.C.; ROAT, T.C.; ZACARIN, E.C.M.C.; MALASPINA, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. **Semana dos Polinizadores**, v.3, p.196-212, 2012.

Silva et al, 2023_ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E MORFOFISIOLÓGICO HEPÁTICO EM TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA COM BIOINSETICIDA A BASE DE Bacil

PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M. Características morfológicas, morfométricas e citoquímicas das células sanguíneas da arraia ocelada *potamotrygon mototo* (Elasmobranchii, Potamotrygonidae): estudo de caso. **Ensaio e Ciência**, v.14, n.1, p.147-158, 2010.

PAIXÃO, P.E.G.; CUNHA, F.S.; SOUSA, N.C.; SOUSA, J.C.N.; NEVES, M.S.; MENEZES, J.O.; SANTOS, R.F.B.; COUTO, M.V.S.; SANTOS, R.T.V.S.; FUGIMOTO, R.Y. Características hematológicas do peixe ornamental amazônico *Symphysodon aequifaciatus* submetido a condições de cativeiro. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v.6, n.1, p.53-62, 2017.

PAULINO, M.G.; TAVARES, D.; TEREZAN, A.P.; SAKURAGUI, M.M.; PESENTI, E.; GIANI, A.; CESTARI, M.M.; FERNANDES, J.B.; FERNANDES, M.N. Biotransformations, Antioxidant System Responses, and Histopathological Indexes in the Liver of Fish Exposed to Cyanobacterial Extract. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.39, n.5, p.1041-1051, 2020.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013.

ROMAN, E.E., BECKIE, H., VARGAS, L., HALL, L., RIZZARDI, M.A., WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação**. Passo Fundo. Gráfica Editora Berthier, 160p., 2007.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M. M.; PAULINO, M. G.; FERNANDES, M. N. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. **Environmental monitoring and assessment**, v. 181, p. 29-42, 2011.

SANCHIS, V., BOURGUET, D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. **Agron. Sustain. Dev.** v.28, p.11-20, 2008.

SANTOS, V. C. **Estudo da via de sinalização da apoptose de neutrófilos em atletas praticantes de meia maratona suplementados ou não com óleo de peixe**. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

SARAN NETO, A.; MARIANO, W.S.; SÓRIA, S.F.P. **Tópicos especiais em saúde e criação animal**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009.

SCHIEHL, A.; HENNIG, T.B.; BANDEIRA, F.; TONIOLO, T. Risco tóxico Imidacloprid para a sobrevivência de minhocas da espécie *Eisenia andrei* em um solo natural tropical. **71ª Reunião Anual da SBPC - 21 a 27 de julho de 2019 - UFMS - Campo Grande / MS**.

SILVA, J. A. S. E.; LIMA, T. A. X.; BLANCO, B. S. HEMATOLOGIA EM PEIXES. **Revista Centauro**, v.3, n.1, p.24 - 32, 2012.

SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; BARBIERI, R. L. Induced inflammatory response in the Antarctic fish *Notothenia neglecta*. **Polar Biology**, v.20, p.206-212., 1998.

SILVA, S.A.; MARIANO, W.S.; PAULINO, M.G. Variáveis hematológicas de *Oreochromis niloticus* como biomarcadores de efeitos para a exposição subletal aguda ao biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Desafios**, v. 7, Especial - PIBIC, 2020.

Silva et al, 2023_ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E MORFOFISIOLÓGICO HEPÁTICO EM TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*, APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA COM BIOINSETICIDA A BASE DE Bacil

SIMÃO, A.M.T.; SILVA, D.C.; SOARES, M.A.M.; DIAS, G.V.B.; FERREIRA, E.R.R.; MORON, S.E.; MARIANO, W.S.; PAULINO, M.G. Avaliação de toxicidade de biopesticida comercial à base de *Bacillus thuringiensis* em tilapia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Research, Society and Development**, v.10, n.8, 2021.

SUDAKIN, D.L. Biopesticidas. **Toxicol. Rev.** v.22, n.2, p.83-90, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features**. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, Edição 2, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichethyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pagues” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 76-82., 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 144p., 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish A cytochemical study and ultrastructural analysis. **J. Appl. Ichthyol**, v.23, p.709-712, 2007.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pestic. Biochem. Phys.** v.90, p.42-51, 2008.

VIVAS, W.L. **Manual Prático de Hematologia**. 33p. (2016). Disponível em 23/04/2016 <http://www.aa.med.br/upload/biblioteca/Manual%20de%20Hematologia.pdf>. Acesso em 19 de maio de 2023.