

**SEQÜÊNCIA TEMPORAL NO SURGIMENTO DE  
LESÕES HEPÁTICAS EM TRUTA ARCO-ÍRIS,  
*Oncorhynchus mykiss* (OSTEICHTHYES,  
SALMONIDAE), EM CULTIVO, COM  
DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA<sup>1</sup>.**

Agar Costa Alexandrino<sup>2\*</sup>  
Maria Cecília Rui Luvizotto<sup>3</sup>  
José Mandelli Jr<sup>2</sup>  
Sarah Arana<sup>4</sup>  
Yara Aiko Tabata<sup>2</sup>  
Marcos Guilherme Rigolino<sup>2</sup>

**1. INTRODUÇÃO**

O carcinoma hepatocelular é uma formação neoplásica maligna que pode acometer os teleósteos (17).

Em truta arco-íris, em cativeiro, tem havido a preocupação com a descrição das lesões hepáticas, bem como com a sua patogenia, sendo, inicialmente, a preocupação maior com o hepatoma (11, 19).

<sup>1</sup> Trabalho extraído da tese de Doutor, do primeiro autor, em Patologia Experimental apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da UFF, Niterói - RJ, em 1994. Aceito para publicação em 30.10.1996.

<sup>2</sup> Instituto de Pesca - Av. Francisco Matarazzo, 455 - CEP 05031-900 - São Paulo - SP.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP - Araçatuba - SP.

<sup>4</sup> Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade de Campinas, 13.081-970 Campinas, SP.

\* Bolsista do CNPq.

Posteriormente, em razão da susceptibilidade da truta arco-íris à hepatocarcinogênese, esta espécie passou a ser empregada em numerosos trabalhos experimentais (1, 2, 15, 20).

O estudo histológico da hepatocarcinogênese em roedores (4, 6, 8, 9, 14) faz referência a um padrão de seqüência temporal no surgimento de lesões focais, identificadas pela afinidade tintorial, as quais apresentam, inicialmente, o foco de células claras, o qual é seguido do foco de células acidófilas e, mais tardiamente, do foco de células basófilas, sendo todos estes classificados, supostamente, como lesões pré-neoplásicas, que iriam originar o carcinoma hepatocelular.

Assim como nos roedores, nos quais as lesões pré-neoplásicas permitem detectar experimentalmente a toxicidade e, ou, a carcinogenicidade de vários compostos químicos e de alterações nutricionais, também na truta tais lesões permitem diagnosticar o manejo inadequado no cultivo (18).

Este trabalho objetiva descrever lesões hepáticas que vão surgindo em truta arco-íris cultivadas, dando-se ênfase àquelas provavelmente envolvidas em hepatocarcinogênese.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado na Estação Experimental de Salmonicultura do Instituto de Pesca Dr. Ascânio de Faria, localizada em Campos do Jordão (22° 45' S - 45° 30' W), São Paulo. Os animais foram mantidos em tanques de alvenaria, e a taxa de arraçoamento variou de 1 a 5% do peso vivo ao dia, decrescendo com o aumento do tamanho do peixe (12). A ração, produzida comercialmente, foi fornecida em duas porções diárias, cuja quantidade foi calculada pela pesagem da biomassa.

As coletas iniciaram-se em janeiro de 1989, quando os alevinos tinham três meses de idade, e terminaram em setembro de 1992, quando os adultos completaram 48 meses. Os animais, escolhidos ao acaso, foram sacrificados mensalmente, de modo que o total, para cada grupo etário, variou conforme o Quadro 1.

Os animais foram sacrificados por imersão em solução aquosa de benzocaína (100 ppm) e necropsiados para a retirada do fígado, totalizando 178 espécimens distribuídos em oito grupos.

Para análises dos preparados histológicos de fígado, foram fixadas amostras em formol a 10%, tamponado, seguindo rotina de inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram corados pela HE, tricrômico de Masson e Krajian - Prata Amoniacal. Amostras semelhantes foram cortadas em criostato e coradas em Sudan III Escarlata R (7). Foi ainda utilizado o

QUADRO 1 - Número de trutas utilizadas por faixa etária

Grupo	Faixa Etária	Nº de Trutas
1	03 meses	50
2	04 a 06 meses	13
3	07 a 09 meses	17
4	10 a 12 meses	23
5	13 a 18 meses	20
6	19 a 24 meses	19
7	25 a 36 meses	19
8	37 a 48 meses	17
	TOTAL	178

método de coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) (13).

Nos cortes histológicos de fígado, foi utilizado o critério de presença e ausência das seguintes alterações, que estão diretamente envolvidas com a hepatocarcinogênese (3) : esteatose, necrose, presença de focos de células claras, de células acidófilas, de células basófilas, bem como evidência de neoplasia. Para cada um dos grupos etários, as freqüências de diagnósticos positivos e negativos foram expressas de modo absoluto e, as de positivo, também em porcentagem. Para verificar se as freqüências de ocorrência dessas lesões em cada grupo etário diferiram significativamente entre si, foi feito o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a 5% (16).

### 3. RESULTADOS

Nos 178 animais analisados, realizaram-se 1.068 diagnósticos de alterações morfológicas microscópicas no parênquima e estroma hepáticos, dos quais 249 foram identificados como positivos.

As freqüências absolutas de diagnósticos positivos e negativos correspondentes a cada grupo etário encontram-se no Quadro 2, enquanto as freqüências relativas de diagnósticos positivos são mostradas no Quadro 3.

No Quadro 3, verifica-se ausência de alterações hepáticas nos alevinos com três meses de idade (Figura 1a). Aos seis meses, foi evidenciado que a esteatose de idade (Figura 1b) era mais freqüente que a necrose (Figura 1). Aos nove meses de idade, além das alterações já descritas, foram diagnosticadas, pela primeira vez, lesões supostamente pré-neoplásicas, representadas pelos focos de células claras (Figura 1d) e focos de células acidófilas (Figura 1e). Aos 12 meses, foram detectados os

QUADRO 2 - Freqüências absolutas de diagnósticos positivos (+) e negativos (-) correspondentes a cada grupo etário da truta arco-íris, *O. mykiss*.

Freqüências de Diagnósticos							
GE	E (+)(-)	N (+)(-)	FC (+)(-)	FA (+)(-)	FB (+)(-)	CH (+)(-)	Nº de Trutas
1	0(50)	0(50)	0(50)	0(50)	0(50)	0(50)	50
2	3(10)	1(12)	0(13)	0(13)	0(13)	0(13)	13
3	10(7)	3(14)	1(16)	1(16)	0(17)	0(17)	17
4	18(5)	4(19)	1(22)	1(22)	0(23)	0(23)	23
5	16(4)	6(14)	1(19)	3(17)	1(19)	6(14)	20
6	17(2)	4(15)	0(19)	9(10)	4(15)	15(4)	19
7	19(0)	7(12)	1(18)	13(6)	3(16)	19(0)	19
8	16(1)	10(7)	0(17)	14(3)	5(12)	17(0)	17
T.d.	99(79)	35(143)	4(174)	41(137)	13(165)	57(121)	178
T.a.	178	178	178	178	178	178	178

T.a. : Total de animais

T.d.: Total de diagnósticos

GE: Grupo etário

FC: Foco de células claras

E: Esteatose

FA: Foco de células acidófilas

N: Necrose

FB: Foco de células basófilas

CH: Carcinoma hepatocelular

QUADRO 3 - Freqüências relativas de diagnósticos positivos correspondentes a cada grupo etário da truta arco-íris, *O. mykiss*

Freqüência de Diagnósticos						
GE	E	N	FC	FA	FB	CH
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	23.07	7.69	0.00	0.00	0.00	0.00
3	58.82	17.64	5.88	5.88	0.00	0.00
4	78.26	17.39	4.34	4.34	0.00	0.00
5	80.00	30.00	5.00	15.00	5.00	30.00
6	89.47	21.05	0.00	47.36	21.05	78.94
7	100.0	36.84	5.26	68.42	15.78	100.00
8	94.11	58.82	0.00	82.35	29.41	100.00

GE: Grupo etário

N: Necrose

FA: Foco de células acidófilas

E: Esteatose

CH: Carcinoma hepatocelular

FB: Foco de células basófilas

FC: Foco de células claras

mesmos tipos de lesões do grupo etário anterior. Aos 18 meses, ao lado das lesões já descritas, surgiram os focos de células basófilas (Figura 1f) e as lesões neoplásicas, identificadas como carcinoma hepatocelular (Figura 1g). Aos 24 meses, observa-se aumento da frequência de carcinoma hepatocelular e ausência de focos de células claras. Todos os fígados de truta de 36 e 48 meses de idade apresentaram neoplasias detectadas à microscopia, sendo importante ressaltar que, concomitante às alterações neoplásicas, foram observadas nos fígados todas as outras lesões de cunho degenerativo e pré-neoplásico detectadas nos grupos anteriores.

A frequência da esteatose variou significativamente ( $\chi^2$  crítico igual a 14,07 e  $\chi^2$  igual a 112,1), tendendo a aumentar com a idade; com a necrose ocorreu o mesmo ( $\chi^2$  crítico igual a 14,07 e  $\chi^2$  igual a 34,71). Os focos de células claras tenderam a apresentar frequência constante a partir dos nove meses de idade; a análise não revelou diferença significativa entre as frequências observadas em cada grupo etário ( $\chi^2$  crítico igual a 14,07 e  $\chi^2$  igual a 5,55). A frequência dos focos de células acidófilas, a partir do seu aparecimento aos 12 meses de idade, sofreu aumento constante e significativo ( $\chi^2$  crítico igual a 14,07 e  $\chi^2$  igual a 92,94). A frequência de células basófilas, a partir do seu surgimento aos 18 meses de idade, variou significativamente ( $\chi^2$  crítico igual a 14,07 e  $\chi^2$  igual a 27,8), com tendência a aumentar com o correr dos anos. O carcinoma hepatocelular foi identificado aos 18 meses de idade e mostrou tendência a aumentar, em frequência, com a idade, sendo esta tendência estatisticamente significativa ( $\chi^2$  crítico igual a 14,07 e  $\chi^2$  igual a 144,19). A descrição resumida das lesões supracitadas encontra-se no Quadro 4.

#### 4. DISCUSSÃO

Em peixes, de modo geral, e em trutas, de modo particular, a literatura consultada não faz referências à seqüência temporal no surgimento dos focos de células claras (FC), de células acidófilas (FA) e de células basófilas (FB) e carcinoma hepatocelular (CH). A seqüência verificada neste trabalho, isto é, FC, FA, FB e CH, aproxima-se dos resultados obtidos em mamíferos por FARBER (9,10), BANNASCH *et alii* (6), BANNASCH (4), ENZMANN e BANNASCH (8) e OGISO *et alii* (14). Em face do exposto, infere-se que tais lesões e a seqüência temporal do seu surgimento não sejam, portanto, específicas de mamíferos.

O fígado de truta acima de 24 meses de idade apresenta frequência maior de FA em relação a FC e FB. O fato de apresentar menor frequência em relação a FA, em trutas acima de 24 meses de idade, pode ser

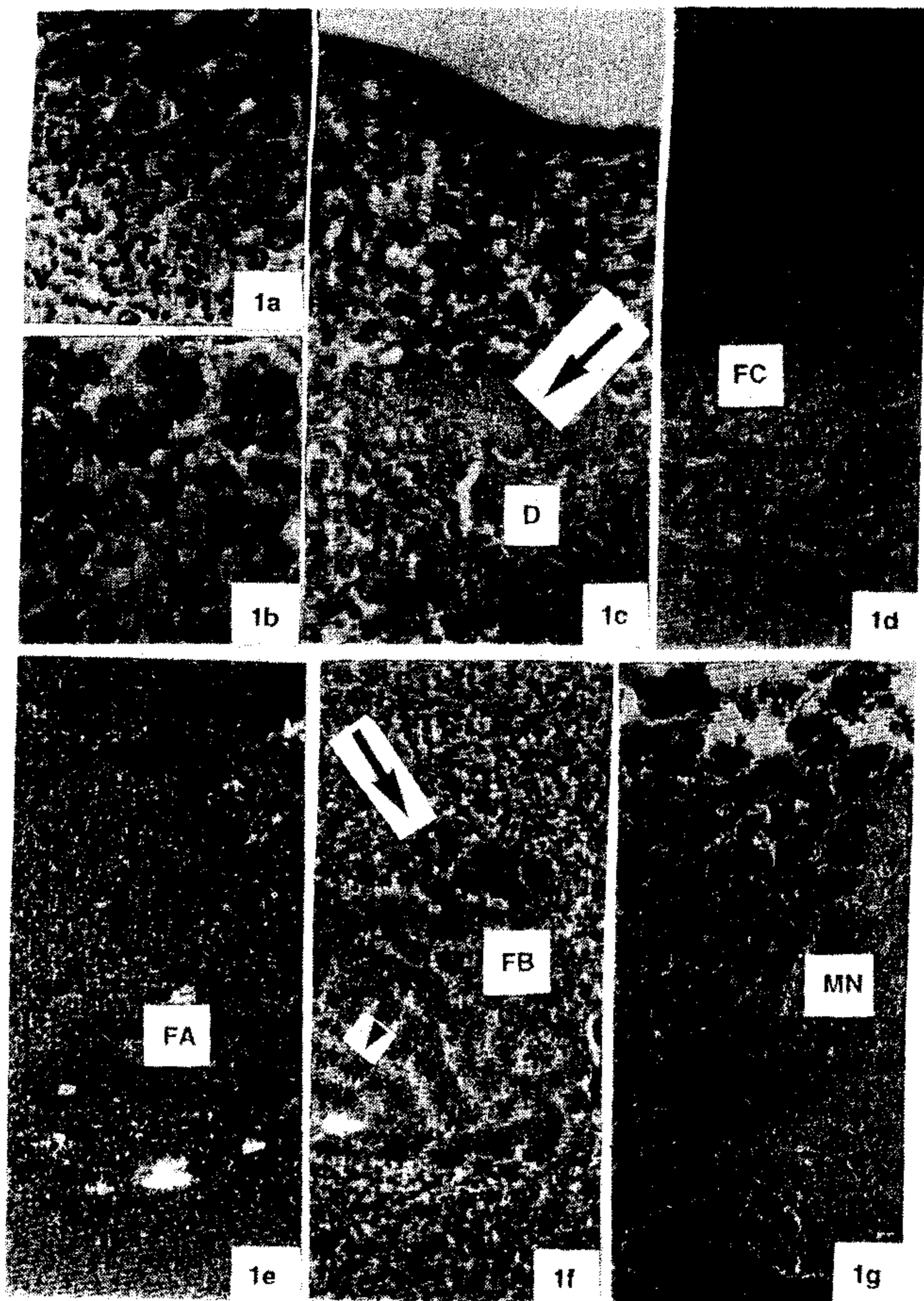


FIGURA 1 - Fígado de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*.

- a. Aspecto normal em alevinos de três meses de idade, com arranjo tubular dos hepatócitos. HE. 250 X.
- b. Microvacuolização citoplasmática difusa. HE. 400 X.
- c. Necrose periductal (seta). HE. 250 X.
- d. Foco de células claras (FC). PAS. 100 X.
- e. Foco de células acidófilas (FA). HE. 40 X.
- f. Foco de células basófilas (FB). HE. 100 X.
- g. Carcinoma hepatocelular com aspecto micronodular (MN), em que se observam trabéculas conjuntivas isolando grupos de células neoplásicas (seta). HE. 125 X.

QUADRO 4 - Características histológicas e histoquímicas das lesões hepáticas, em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*

Lesões hepáticas	Morfologia			Características tintoriais
	Núcleo	Núcleo	Citoplasma	
Esteatose	Normal	Normal; Frequentemente na periferia da célula	Micro e macro-vacuolização	Positiva ao Sudam III
Necrose	Ocasionalmente perda total da estrutura	Picnótico da frequentemente	Aumento da acidofilia ou perda da coloração	Normal ou ligeiramente reduzido
Foco claro	Ligeiramente hipercromático	Ligeiramente pleomórfico, central e diminuído	Pálido com discreta granulação eosinofílica	Ligeiramente diminuído
Foco eosinofílico	Hipercromático	Ligeiramente pleomórfico	Aumento da eosinofilia	Ligeiramente aumentado
Foco basofílico	Ligeiramente hipercromático	Raramente pleomórfico	Basofilia aumentada	Ligeiramente diminuído
Carcinoma hepatocelular	Aumentado; hipercromático	Aumentado com distribuição não usual da cromatina	Aumento da basofilia; ocasionalmente vacuolização citoplasmática	Ligeiramente diminuído

PAS negativo com  
algumas células  
atípicas positivas;  
perda da polaridade;  
ausência de fibras  
reticulares ao  
Krajan-Prata Amoniacal

explicado, provavelmente, por uma rápida transformação destes em neoplasia, concordantemente com BANNASCH (5).

SIRICA (21), revisando o assunto, afirma que um dos melhores sistemas experimentais para se investigar os estágios pré-neoplásicos é o fígado de rato. Contudo, pelos resultados expostos, conclui-se que lesões pré-neoplásicas em truta arco-íris evoluem de maneira semelhante às observadas em mamíferos, podendo-se, assim, empregar também esta espécie em testes de carcinogenicidade hepática.

Os resultados indicam existir a seguinte seqüência temporal no surgimento de lesões hepáticas em *O. mykiss* : as iniciais são de caráter degenerativo, representadas pela esteatose, seguidas pela necrose e, sucessivamente, pelo foco de células claras, foco de células acidófilas, foco de células basófilas e, finalmente, pelo carcinoma hepatocelular, lesões estas que parecem não diferir, histologicamente, das descritas em roedores por OGISO *et alii* (14).

## 5. RESUMO

Este experimento objetivou acompanhar a seqüência temporal do surgimento de lesões supostamente relacionadas com a hepatocarcinogênese em truta arco-íris, a partir de três meses de idade. Coletas mensais durante 45 meses resultaram em 178 animais analisados. O exame histopatológico do fígado demonstrou que as lesões ocorreram na seguinte ordem : esteatose, necrose, foco de células claras, foco de células acidófilas, foco de células basófilas e carcinoma hepatocelular. Estas lesões são muito semelhantes às descritas em roedores.

## 6. SUMMARY

(TEMPORAL SEQUENCE IN THE EMERGENCE OF HEPATIC LESIONS IN RAINBOW TROUT, *Oncorhynchus mykiss* (OSTEICHTHYES, SALMONIDÆ), IN CULTURE, WITH HISTOPATHOLOGICAL DESCRIPTION).

This experiment analyzes the temporal sequence of emergence of lesions supposedly related to hepatocarcinogenesis in rainbow trout from three months after spawning onwards. The histopathological analysis showed that the lesions occurred in the following sequence: steatosis, necrosis, clear cell focus, acidophilic cell focus, basophilic cell focus and hepatocellular carcinoma. These lesions are similar to those described in rodents.



## 7. LITERATURA CITADA

1. ARKOOCH, M. R. & KAATTARI. Effect of early aflatoxin B1 exposure in vivo and in vitro and antibody responses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J.Fish Biol.*, 31 (supl. A ): 19-22, 1987.
2. BAILEY, G. S.; HENDRICKS, J.D., NIXON, J.E. & PAWLOWSKI, N.E. The sensitivity of rainbow trout and other fish to carcinogens. *Drug Metab. Rev.*, 15: 725-750, 1984.
3. BANNASCH, P. Sequential cellular alterations during hepatocarcinogenesis. In: NEWBERNER, P.M. & BUTLER, W.H. (eds). *Rat hepatic neoplasia*. Massachusetts, MIT Press, 1978. p. 58-93.
4. BANNASCH, P. Sequential cellular changes during chemical carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 108: 11-12, 1984.
5. BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis*, 7 : 689-695, 1986.
6. BANNASCH, P. ; MOOERE, M.A. ; KLIMEK, F. & ZERBAN, H. Biological markers of preneoplastic foci and neoplastic nodules in rodent liver. *Toxicol. Path.*, 10 : 19-34, 1982.
7. BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M.C. & FREITAS NETO, A. G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo, Edart, 1976. 241p.
8. ENZMANN, H. & BANNASCH, P. Pontential significance of phenotipic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* , 8: 1607-1612, 1987.
9. FARBER, E. Hyperplastic liver nodules. *Meth. Cancer Res.*, 7: 345-375, 1973.
10. FARBER, E. The sequential analyses of liver cancer induction. *Biochem. Physiol. Acta*, 605: 149-166, 1980.
11. GHITTINO, P. & CERETTO, F. Studio sulla epizootogenesi dell epatoma della trota iridea di allevamento. *Tumori*, 48: 393-409, 1962.
12. LEITRITZ, E. & LEWIS, R.C. Trout and salmon culture ( Hatchery methods). *Fish Bulletin*, 164 : 1-197, 1976.
13. Mc MANNUS, J. F. A. Histological demonstration of mucina after periodic acid. *Nature*, 158: 202, 1946.
14. OGISO, T.; TATEMATSU, M.; TAMANO, S.; HASEGAWA, R. & ITO, N. Correlation between medium - term liver bioassay system data and results of long - term testing in rats. *Carcinogenesis*, 11: 561-566, 1990.
15. PARKER, L.M. ; LAUREN, JD.; ITAMMOCH, B.D.; WINDER, B. & HINTOU, D. Biochemical and histochemical properties of hepatic tumors of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Carcinogenesis* ,14: 211-217, 1993.
16. PIMENTEL -GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. São Paulo, Livraria Nobel, 1982. 430 p.
17. REINCHENBACH-KLINKE, H. H. *Enfermidades de los peces*. 2ª ed. España, Acribia, 1982. 507 p.
18. ROBERTS, R. J. *Patologia de los peces*. Madrid, Mundi-Prensa, 1981. 366 p.
19. SCARPELLI, D. G.; FREIDER, M.H. & FRAJOLA, W.J. Observations on hepatic cell hyperplasia, adenoma, and hepatoma of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) . *Cancer Research*, 23 : 848-857, 1963.

20. SINNHUBER, R.O.; LEE, D.J.; WALES, J.H. & AYRES J.L. Dietary and hepatoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Cocarcinogenesis by cyclopropenoid fatty acids and the effect of gossypol and altered lipids on aflatoxin-induced liver cancer. *J. Nat. Cancer Inst. Bethesda*, 41 : 1293-1301, 1968.
21. SIRICA, A.E. *The pathobiology of neoplasia. Chronology of significant events in the study of neoplasia*. New York, Plenum Press, 1989. p.1.