

# INTEGRIDADE DO EPITÉLIO OLFATÓRIO EM PEIXES EXPOSTOS AO PETRÓLEO DE URUCU

Kinny Derzy Amazonas NOGUEIRA<sup>1</sup>; Fabíola Xochilt Valdez DOMINGOS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPQ; <sup>2</sup>Orientador CBIO/INPA

## 1. Introdução

O epitélio olfatório, também chamado de epitélio olfativo ou roseta olfativa, é um tecido epitelial sensorial que reveste o órgão olfativo. O epitélio olfatório está localizado no focinho, ou seja, na parte da cavidade nasal do peixe a qual é protegida por mucosas. É um tecido muito sensível e geralmente está vulnerável à poluição química, pois suas células receptoras estão em constante contato com o ambiente aquático. Além disso, os peixes dependem destas células para receber informações que fazem parte do seu ciclo de vida (Julliard, 1995). O epitélio olfatório é responsável por transmitir informações ambientais para outros peixes, permitindo atividades como acasalamento, localizar alimentos, discriminar parentes, evitar predadores, liberação de um feromônio de alarme de um peixe ferido nas proximidades, migração, funciona na percepção do cheiro e sabor, permite a sobrevivência e facilita a reprodução (Tierney *et al.*, 2009).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de peixe típica da Amazônia que apresenta sua biologia especialmente adaptada às condições especiais encontradas nesse bioma. Quando adulto, é essencialmente frugívoro, alimentando-se de frutos e sementes (Ferreira *et al.*, 1998). As águas barrentas na maioria dos habitats de criação de juvenis na várzea e o ambiente escuro embaixo da vegetação flutuante sugerem que o uso da visão do tambaqui é muito limitado (Araujo-Lima e Goulding, 1998) sendo a olfação determinante na aquisição de informações acerca do ambiente. Acredita-se que o tambaqui adulto localize as espécies de árvores das quais se alimenta, dos frutos e sementes pelo olfato (Goulding, 1997).

A exploração de petróleo na Amazônia ocorre desde 1986 e desde então alguns pequenos derramamentos já ocorreram, o que ressalta a suscetibilidade da região e a importância de se estudar os efeitos do petróleo sobre organismos aquáticos da Amazônia (Petrobrás, 2008). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa já demonstraram alguns efeitos prejudiciais do petróleo sobre peixes amazônicos. A expressão de genes relacionados à detoxificação de compostos petrogênicos (CYP1A) foi detectada em tambaquis (*Colossoma macropomum*) expostos ao petróleo de Urucu (Matsuo *et al.*, 2006). O tamuatá (*Hoplosternum littorale*) apresentou alteração na frequência respiratória e osmorregulação após a exposição a petróleo produzido na Amazônia (Brauner *et al.*, 1999). No entanto, o trabalho desenvolvido por Kochhann (2010) demonstrou que juvenis de tambaqui expostos ao petróleo durante 15 e 30 dias apresentaram alteração no padrão de resposta à substância de alarme se comparados aos peixes do grupo controle. Um grupo de peixes neste mesmo experimento foi exposto a um óleo mineral inerte e após 30 dias também foi observada alteração na percepção da substância de alarme pelos peixes. Estes resultados mostraram que há um comprometimento da capacidade olfativa nos peixes expostos ao petróleo produzido na Amazônia e ao óleo mineral e nos levaram a questionar se este efeito poderia estar associado a danos histopatológicos no epitélio olfatório destes animais.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos do petróleo de Urucu na integridade do epitélio olfatório da espécie amazônica *Colossoma macropomum*, estabelecendo um protocolo de descalcificação para as rosetas olfatórias, verificando se as exposições às frações solúveis e insolúveis de um óleo inerte e de petróleo causam danos no epitélio olfatório de tambaqui comparando a ocorrência de danos entre os diferentes tratamentos.

## 2. Materiais e Métodos

A execução do experimento e a obtenção das amostras avaliadas neste projeto foram realizadas em 2009 pela equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) – INPA. O experimento consistiu na exposição de juvenis de tambaqui durante 15 dias aos seguintes tratamentos: água do poço (controle); fração insolúvel do óleo cru; fração solúvel do óleo cru; fração insolúvel do óleo mineral inerte; fração solúvel do óleo mineral inerte. Foram utilizados 6 peixes para cada tratamento e cada tempo de exposição, totalizando 30 animais. A preparação das frações solúvel e insolúvel foi realizada de acordo com Anderson *et al.* (1974) e a qualidade da água foi monitorada durante o experimento. Os exemplares de tambaqui foram anestesiados em MS222 tamponado com bicarbonato de sódio e sacrificados por secção medular. As rosetas olfatórias dos peixes foram dissecadas, fixadas em ALFAC (etanol, formol e ácido acético) e preservadas em etanol 70 %. A fim de possibilitar a obtenção de cortes histológicos ao micrótomo, as rosetas olfatórias foram descalcificadas em uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Obtivemos os melhores resultados de descalcificação mantendo as amostras em TCA durante 7 dias com troca da solução cada 2 dias. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série decrescente de alcoóis e fez-se o processo de diafanização com xilol, sendo assim, emblocadas com paraplast. Foram preparadas lâminas histológicas com cortes de 5 um de espessura, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina. A morfologia do epitélio foi analisada em microscópio óptico e as imagens foram foto documentadas.

### 3.Resultados e Discussão

Embora tenham sido preparadas lâminas de todas as amostras, a identificação do epitélio olfatório foi bem sucedida em apenas algumas lâminas (Tabela 1). O epitélio olfatório apresentou hipertrofia das células apenas nos peixes expostos ao tratamento com petróleo (Figura 1). Os peixes expostos às frações insolúveis do óleo mineral e do petróleo apresentaram graves danos à superfície apical, porém a continuidade da superfície epitelial se encontrou mais preservada no tratamento com óleo mineral insolúvel (Figura 1). No entanto, no tratamento com petróleo, o epitélio olfatório apresentou poucos vacúolos largos e hipertrofia das células (Figura 1).

Tabela 1. Danos identificados no epitélio olfatório em juvenis de tambaqui expostos por 15 dias a diferentes tratamentos.

| Danos                                  | Solúvel petróleo (n=1) | Insolúvel petróleo (n=2) | Solúvel óleo mineral (n=2) | Insolúvel óleo mineral (n=2) | Controle (n=3) |
|--|------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------|
| Espaços amplos entre as células        | X                      | X                        | X                          | X                            | --             |
| Hipertrofia das células                | X                      | X                        | --                         | --                           | --             |
| Graves danos à superfície apical       | X                      | X                        | X                          | X                            | --             |
| Rede de cílios e microvilos danificada | X                      | X                        | X                          | X                            | X              |
| Necrose                                | X                      | X                        | X                          | X                            | --             |
| Superfície epitelial em degeneração    | X                      | X                        | X                          | --                           | --             |

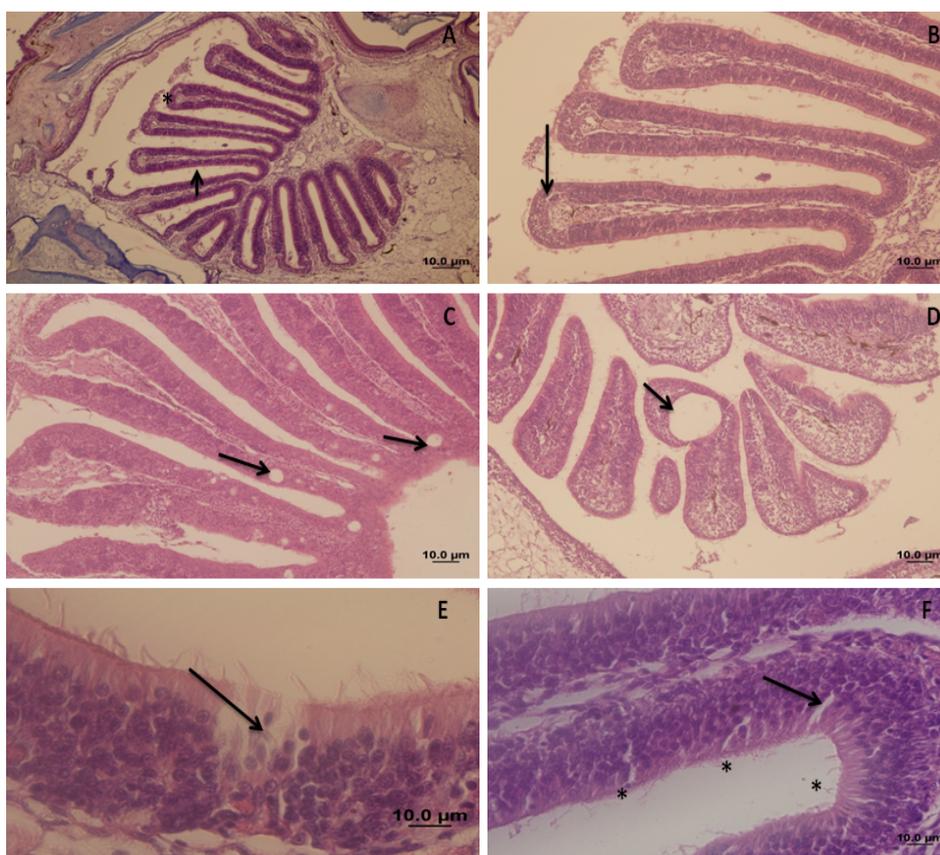


Figura 1. Epitélio olfatório de *Colossoma macropomum*. (A) Aspecto normal do tecido. Note a integridade da superfície epitelial (seta) e da região apical (\*). (B) Epitélio olfatório com aspecto mais solto na região apical (seta); (C) Presença de pequenos vacúolos entre as células (setas); (D) Presença de vacúolo extremamente largo na região basal da mucosa olfativa (seta); (E) Área de necrose (seta); (F) Espaços amplos entre as células (seta) e rede de cílios e microvilos danificada (\*).

Este é o primeiro estudo a descrever os efeitos do petróleo no epitélio olfatório de peixes. Encontramos na literatura apenas trabalhos que avaliaram danos ao epitélio olfatório induzidos por metais como o mercúrio (Oliveira Ribeiro *et al.*, 1999) e o cobre (Saucier e Astic, 1995; Bettini e Franceschini, 2006). Os

peixes expostos ao cobre mostraram danos se espalhando a partir da região apical para a região basal da mucosa olfativa, com degeneração maciça da população celular (Bettini e Franceschini, 2006).

#### 4. Conclusão

A exposição de tabaqui a um óleo inerte afeta a estrutura do epitélio olfatório e tanto a fração solúvel e insolúvel do petróleo são capazes de causar danos no epitélio olfatório de tabaqui. Os danos causados pelo petróleo foram mais severos do que os causados pelo óleo mineral. Este foi o primeiro estudo a descrever os efeitos do petróleo no epitélio olfatório de peixes e a sua continuidade é de fundamental importância devido a suscetibilidade dos peixes da região amazônica à poluição por petróleo.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Anderson J.W., Neff J.M., Cox B.A., Tatem H.E., Hightower G.M., 1974. Characteristics of dispersions and water soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology* 27, 75–88.
- Araujo-Lima, C., Goulding, M. 1998. *Os frutos do tabaqui*. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé.
- Bettini, S., Ciani, F.; Franceschini, V. 2006. Recovery of the olfactory receptor neurons in the African *Tilapia mariae* following exposure to low copper level. *Aquatic Toxicology* 76(3–4): 321-328.
- Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Vijayan, M.M., Val, A.L., 1999. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123, 127-134.
- Ferreira, E.J.G., Zuanon, J.A.S., Santos, G.M., 1998. *Peixes comerciais do Amazonas: Região de Santarém, Pará*. IBAMA, Brasília.
- Goulding, M., 1997. *História natural dos rios amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília.
- Julliard, A.K., Saucier, D., Astic, L., 1995. Metal X-ray microanalysis in the olfactory system of rainbow trout exposed to low level of copper. *Biology of the Cell* 83, 77-86.
- Kochhann, D., 2010. *Exposição do tabaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p. 64.
- Matsuo, A.Y.O., Woody, B.R., Reddy, C.M., Val, A.L., Stegeman, J.J., 2006. Humic Substances and Crude Oil Induce Cytochrome P450 1<sup>a</sup> Expression in the Amazonian Fish Species *Colossoma macropomum* (Tabaqui). *Environmental Science and Technology* 40, 2851-2858.
- Oliveira-Ribeiro, C.A.; Fernandes, L.M.; Carvalho, C.S.; Cardoso, R.I.; Turcatti, N.M. 1999. Acute effects of mercuric chloride on the olfactory epithelium of *Trichomycterus brasiliensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 104-109.
- Petrobras, 2008. Província petrolífera de Urucu 20 anos - O desafio de produzir ouro negro na Amazônia. (<http://www2.petrobras.com.br/minisite/urucu/urucu.html>). Acesso: 24/06/2008.
- Saucier, D., Astic, L. 1995. Morpho-functional alterations on the olfactory system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and possible acclimation in response to long-lasting exposure to low copper levels. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112A, 2, 273-284.
- Tynerney K., Baldwin D., Hara T., Ross P., Scholz N., Kennedy C., 1995. Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology* 96 (2010), 2-5.