



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Giuliam Kátia Strücker

Efeitos da radiação ultravioleta B em embriões e larvas do camarão de água-doce
Macrobrachium olfersii: análises morfológicas, celulares e moleculares

Florianópolis

2024

Giuliam Kátia Strücker

Efeitos da radiação ultravioleta B em embriões e larvas do camarão de água-doce
Macrobrachium olfersii: análises morfológicas, celulares e moleculares

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari

Florianópolis

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Strücker, Giuliam Kátia

Efeitos da radiação ultravioleta B em embriões e larvas
do camarão de água-doce *Macrobrachium olfersii*: análises
morfológicas, celulares e moleculares / Giuliam Kátia
Strücker ; orientadora, Evelise Maria Nazari, 2024.

93 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Embriotoxicidade. 3. Mitofagia. 4. Crustacea. 5.
Mitocôndria. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Giuliam Kátia Strücker

Efeitos da radiação ultravioleta B em embriões e larvas do camarão de água-doce *Macrobrachium olfersii*: análises morfológicas, celulares e moleculares

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Juliana Dal-Ri Lindenau

Prof^a. Dr^a. Viviane Glaser

Dr^a. Madson Silveira de Melo

Certificamos que esta é **a versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Desenvolvimento.

Prof^a. Dr^a. Juliana Dal-Ri Lindenau
Coordenadora do Programa

Prof^a. Dr^a. Evelise Maria Nazari
Orientadora

Florianópolis, 2024.

Aos meus pais, Noemia e Vilmar, à
minha irmã Kellin e ao meu marido
Anderson, que, com muito carinho
e apoio, não mediram esforços
para que eu alcançasse esta etapa
da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta tese.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD), pela estrutura e pelos professores capacitados, fundamentais na minha formação acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Evelise Maria Nazari, por confiar em mim e me acolher em seu laboratório. Agradeço imensamente por toda a atenção, paciência e trocas científicas que contribuíram para meu desenvolvimento nas Ciências. Obrigada por me proporcionar fazer parte do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA)!

À Prof^a Dr^a Yara Rauh Müller, pela convivência e por me ensinar uma nova perspectiva sobre a Educação Básica e Superior, além de compartilhar seu amor pela Ciência.

Agradeço a todos os amigos do LRDA pelo carinho, ensinamentos e ajuda na realização deste trabalho, bem como pela convivência além do laboratório. Em especial, agradeço à Thaline e ao Michael, que realizaram as extrações do RNA total, as sínteses do cDNA dos embriões e as análises de Citometria de Fluxo, possibilitando a realização do artigo científico que compartilhamos em coautoria. Com muito carinho, também agradeço à Nathália, à Méllanie e ao Maico, que dedicaram muitos dias, noites e finais de semana comigo no laboratório. Sou igualmente grata a todos que me acompanharam nas coletas de camarão na Lagoa do Peri, e especialmente ao Madson, por me ensinar a coletar e discutir Ecologia.

Aos membros da banca avaliadora, expresso minha sincera gratidão por aceitarem participar deste momento tão significativo da minha formação. Agradeço pelo tempo dedicado à leitura e à avaliação desta tese.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), pela disponibilidade dos equipamentos e pelo suporte técnico.

Aos meus pais, Noemia e Vilmar, e à minha irmã Kellin, por todo o amor, carinho e por não medirem esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Obrigada pelo amor incondicional, vocês têm minha eterna gratidão!

Ao meu marido Anderson, pelo apoio, incentivo e por nunca me deixar desistir. Realizo mais um sonho, que não é somente meu, mas nosso. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

Aos professores da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ) que fizeram parte da minha formação em nível de Bacharelado, em especial ao Prof. MSc Volnei de Almeida Teixeira (*in memoriam*), que me incentivou a prosseguir no mestrado e doutorado e despertou meu amor pela citologia, histologia e, especialmente, pela embriologia.

Agradeço também à Aline e à Mariah por me receberem em sua casa durante o mestrado e o doutorado. Pela convivência diária, pelas idas à praia e pelas conversas amigáveis que tornaram os anos longe da minha família mais leves.

Por fim, agradeço a Deus por ter me dado saúde e força, que me permitiram chegar até aqui.

Obrigada!

“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn
on the light.”

J. K. ROWLING, 1999.

RESUMO

Os níveis de radiação ultravioleta B (UVB) estão aumentando na superfície terrestre devido às alterações na camada de ozônio. Como resultado, os ambientes aquáticos estão cada vez mais expostos a essa radiação, que tem capacidade de induzir danos nos organismos que habitam e se reproduzem nesses ambientes. Os danos mais conhecidos da radiação UVB em organismos aquáticos incluem alterações morfológicas externas e a formação de dímeros de timina nas moléculas de DNA. Além do DNA, também tem sido demonstrado que as mitocôndrias são alvo dessa radiação, resultando em alterações na dinâmica mitocondrial. *Macrobrachium olfersii*, um camarão de água doce, habita e se reproduz em águas claras e rasas, desempenhando um papel crucial na ciclagem de energia dos ambientes aquáticos, onde os comprimentos de onda da radiação UVB penetram facilmente. As fêmeas carregam os ovos em uma câmara incubadora ventral e externa, o que facilita a exposição dos ovos à radiação UVB durante o desenvolvimento embrionário. As larvas, que são livres-natantes, também estão sujeitas a essa exposição. Nos estágios embrionário e larval de *M. olfersii* não são conhecidos mecanismos de defesa completamente desenvolvidos, tornando-os mais suscetíveis aos danos causados pela radiação UVB. Considerando o panorama apresentado, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos da radiação UVB na indução à mitofagia nas células embrionárias e larvais de *M. olfersii*, bem como analisar as alterações morfológicas, comportamentais e respostas celulares associadas ao dano ao DNA, apoptose e proliferação celular nas células larvais. A partir do transcriptoma dos embriões de *M. olfersii*, foi realizada a identificação das sequências codificantes dos genes associados ao processo mitofágico (autofagia seletiva de mitocôndrias danificadas), incluindo *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Tomm20* e *Opa1*. Os resultados obtidos através da RT-qPCR para a quantificação dos níveis de transcritos desses genes em embriões demonstraram que eles são altamente regulados ao longo do desenvolvimento. Já a quantificação dos transcritos dos mesmos genes em embriões expostos à radiação UVB revelou um aumento significativo em 6 horas após a exposição. A quantificação do número de células positivas para as proteínas PINK1 (indutora de mitofagia), SQSTM1/p62 (adaptadora LC3B), LC3B (membrana de autofagossoma) e TOM20 (membrana mitocondrial externa) demonstrou um aumento significativo em 12 horas após a exposição à radiação UVB nas células embrionárias. Nas células larvais expostas à radiação UVB, também foi observado um aumento no número de células positivas para as proteínas PINK1, SQSTM1/p62, LC3B e TOM20, além de um aumento no número de células positivas para dímeros de timina (dano ao DNA) e caspase3 (apoptose). Adicionalmente, houve diminuição no número de células positivas para proliferação celular (PHH3). Além das respostas celulares, as larvas também apresentaram alterações morfológicas, como mudanças na transparência e no tamanho corporal (cefalotórax e abdômen), alterações no índice do olho e no comportamento de fototropismo positivo. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que as células embrionárias e larvais de *M. olfersii*, quando expostas à radiação UVB, regulam diferentes processos moleculares e celulares para mitigar os danos causados por essa radiação. Adicionalmente, as alterações morfológicas induzidas pela UVB nas larvas podem comprometer o desenvolvimento e sobrevivência de *M. olfersii*, afetando consequentemente a população desse organismo nos ambientes naturais.

Palavras-chave: Autofagia; Crustacea; Fototropismo; Índice do olho; Mitocôndria

ABSTRACT

Ultraviolet B (UVB) radiation levels are increasing at the Earth's surface due to changes in the ozone layer. As a result, aquatic environments are increasingly exposed to this radiation, which has the potential to damage the organisms that inhabit and reproduce in these ecosystems. The most well-known damages of UVB radiation to aquatic organisms include external morphological changes and the formation of thymine dimers in DNA molecules. In addition to DNA, it has been demonstrated that mitochondria are also targets of this radiation, leading to alterations in mitochondrial dynamics. *Macrobrachium olfersii*, a freshwater prawn, lives and reproduces in clear, shallow waters, playing a crucial role in the energy cycle of aquatic environments, where wavelengths of UVB radiation easily penetrate. Females carry their eggs in a ventral, external brood pouch, which increases the eggs' exposure to UVB radiation during embryonic development. Additionally, the free-swimming larvae are also subjected to this exposure. During the embryonic and larval stages of *M. olfersii*, defense mechanisms are not fully developed, making them more susceptible to damage caused by UVB radiation. Given this context, the aim of this thesis was to evaluate the effects of UVB radiation on the induction of mitophagy in embryonic and larval cells of *M. olfersii*, as well as to analyze the morphological, behavioral changes and cellular responses related to DNA damage, apoptosis and cell proliferation in larval cells. Using the transcriptome of *M. olfersii* embryos, the coding sequences of genes associated with the mitophagic process (selective autophagy of damaged mitochondria) were identified, including *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Tomm20* and *Opa1*. The results obtained through RT-qPCR to quantify the transcription levels of these genes in embryos demonstrated that they are highly regulated throughout development. Quantification of transcripts of the same genes in embryos exposed to UVB radiation revealed a significant increase 6 hours after exposure. Quantification of the number of cells positive for the proteins PINK1 (mitophagy inducer), SQSTM/p62 (LC3B adapter), LC3B (autophagosomal membrane) and TOM20 (outer mitochondrial membrane) demonstrated a significant increase within 12 hours after exposure to UVB radiation in embryonic cells. In larval cells exposed to UVB radiation, an increase in the number of cells positive for PINK1, SQSTM1/p62, LC3B and TOM20 proteins was also demonstrated, in addition to an increase in the number of cells positive for thymine dimers (DNA damage) and caspase3 (apoptosis). Additionally, there was a decrease in the number of cells undergoing proliferation (PHH3). Beyond cellular responses, the larvae also displayed morphological changes, including alterations in transparency and body size (cephalothorax and abdomen), variations in the eye index, and changes in positive phototropism behavior. Based on the results obtained, it can be stated that the embryonic and larval cells of *M. olfersii*, when exposed to UVB radiation, regulate different molecular and cellular processes to mitigate the damage caused by this radiation. Additionally, the UVB-induced morphological changes in the larvae may compromise the development and survival of *M. olfersii*, consequently affecting the population of this organism in natural environments.

Keywords: Autofagia; Crustacea; Phototropism behavior; Eye index; Mitochondria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos comprimentos de onda da radiação ultravioleta e a incidência dessa radiação na superfície terrestre, controlada pela camada de ozônio estratosférico.	19
Figura 2. Representação esquemática da formação e dissociação do ozônio. Os comprimentos de onda das radiações UVB e UVC estão envolvidas em reações fotoquímicas que resultam na dissociação da molécula de ozônio em um átomo livre de oxigênio e uma molécula de oxigênio. Subsequentemente, cada átomo livre de oxigênio reage com uma molécula de oxigênio, formando novamente a molécula de ozônio (A). Os comprimentos de onda das radiações UVB e UVC, através de reações fotoquímicas, promovem a liberação de átomos de cloro das moléculas de clorofluorcarbonos. Esses átomos de cloro reagem com átomos de oxigênio, resultando na formação de novos compostos químicos, como o monóxido de cloro (B).	21
Figura 3. Representação esquemática do processo mitofágico, demonstrando a localização e integração das proteínas e organelas envolvidas no controle de qualidade mitocondrial.	27
Figura 4. Representação esquemática da morfologia externa de fêmea adulta, embrião e larva de <i>Macrobrachium olfersii</i> . Fêmea adulta com embriões na câmara incubadora, vista lateral (A). Embrião no 7º dia embrionário, vista lateral (B). Zoea no 1º dia larval, vista dorsal (C). Zoea no 1º dia larval, vista lateral (D).	32
Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental para as análises de embriões e larvas de <i>Macrobrachium olfersii</i>	36
Figura 6. Aquário de irradiação equipado com lâmpada UVB, utilizado para ensaios laboratoriais de irradiação de fêmeas ovígeras e larvas de <i>Macrobrachium olfersii</i> . ..	37
Figura 7. Vista dorsal das larvas de <i>Macrobrachium olfersii</i> . Larva em estágio L1 após a eclosão (A). Esquema representativo das morfometrias realizadas no cefalotórax, abdômen e índice do olho (B).	45
Figura 8. Representação esquemática do aquário utilizado para as análises do comportamento larval de <i>Macrobrachium olfersii</i>	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências nucleotídicas dos genes envolvidos na indução da mitofagia e na codificação das proteínas das membranas mitocondriais, selecionadas do <i>GenBank</i> , utilizadas para a busca de sequências similares no transcriptoma dos embriões de <i>Macrobrachium olfersii</i> , com os números de acesso das sequências de <i>M. olfersii</i> depositadas no <i>GenBank</i>	38
Quadro 2. Sequências de iniciadores dos genes de interesse e eficiência, para análises por RT-qPCR em embriões de <i>Macrobrachium olfersii</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.u.	Unidades arbitrárias
Ab	Abdômen
Ap	Apêndices
BFC	Bromofluorocarbonos
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCB	Centro de Ciências Biológicas
cDNA	DNA Complementar, do inglês <i>complementary DNA</i>
CDS	Região Codificante de um Gene
Cf	Cefalotórax
CFCl ₃	Tricloromonofluormetano
CFC	Clorofluorcarbonos
Cl	Cloro
ClO	Monóxido de cloro
cm ²	Centímetro Quadrado
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cq	Ciclo de Quantificação
DAB	3,3'diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E	Dia Embrionário
EGTA	Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERO	Espécies reativas de oxigênio
G	Gamma
GTR	Reversível no tempo geral, do inglês <i>General time reversible</i>
h	Horas
I	Sítio invariantes, do inglês <i>Invariant sites</i>
IgG	Imunoglobulina G
IO	índice do olho
J	Joule
K ₂	Kimura 2-parâmetros, do inglês Kimura 2-parameters
KCl	Cloreto de Potássio

kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
l	Litros
L1	Larva no primeiro dia, após eclosão
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LO	Lobo óptico
LRDA	Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
MaE	Maior eixo
<i>Map1/c3/LC3B</i>	Microtubule-associated proteins 1 light chain 3 beta
MeE	Menor eixo
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
MOD	Matéria orgânica dissolvida
mRNA	RNA Mensageiro
mW	Miliwatts
n	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato Monossódico
nm	Nanômetros
O	Átomo de Oxigênio
O	Olho
O ₂	Molécula de Oxigênio
O ₃	Gás Ozônio
<i>Opa1/OPA1</i>	Dynamin-like GTPase optic atrophy 1
P.A.	Pureza Analítica
PARL	Mitochondrial Intramembrane Cleaving Protease
pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PC	Papila caudal
PEM-FA	Solução Fixadora
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHH3	Fosfo-histona H3, do inglês <i>Phospho-Histone H3</i>
<i>Pink1/PINK1</i>	PTEN-induced kinase 1

<i>Prkn</i> /Parkin	Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase
R	Rostro
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
<i>RpL8</i> /RPL8	Proteína Ribossomal L8
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<i>Sqstm1</i> /p62	Sequestosome1
T	Télson
T92	Tamura 3-parâmetros, do inglês Tamura 3-parameter
<i>Tomm20</i> /TOM20	Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20
TSA	Transcriptome Shotgun Assembly
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UTR	Região Não Traduzida
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
V	Vitelo
W	Watt
µL	Microlitros
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Radiação ultravioleta	18
1.2. Efeitos da radiação ultravioleta em organismos aquáticos	22
1.3. Eventos celulares inerentes ao desenvolvimento	24
1.4. Modelo biológico de estudo	28
2. OBJETIVOS DA TESE	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Coleta dos animais e obtenção dos embriões e larvas	35
3.2. Delineamento dos grupos experimentais	35
3.3. Procedimentos de irradiação	37
3.4. Análise das sequências codificantes das proteínas associadas à mitofagia em embriões	38
3.4.1. Identificação <i>in silico</i> das sequências codificantes	38
3.4.2. Análise da filogenia dos genes	38
3.4.3. Desenho dos iniciadores para análises por RTq-PCR	39
3.4.4. Extração do RNA total	40
3.4.5. Síntese do cDNA	41
3.4.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR	41
3.5. Procedimentos para microscopia de luz dos embriões e larvas	41
3.5.1. Fixação e inclusão dos embriões e larvas	41
3.5.2. Marcações celulares por imuno-histoquímica nos embriões e larvas	42
3.6. Quantificação de células marcadas por citometria de fluxo nos embriões ...	43
3.7. Análises morfológicas das larvas	44

3.7.1. Morfometria das larvas.....	44
3.7.2. Índice do olho das larvas	44
3.8. Análise do comportamento larval	45
3.9. Análises estatísticas	46
4. CAPÍTULO 1	47
4.1. Contextualização	47
4.1.1. Objetivos específicos da tese contemplados no artigo.....	47
4.1.2. Hipóteses da tese contempladas no artigo.....	48
4.1.3. Materiais e métodos da tese contemplados no artigo	48
4.2. Artigo: UVB radiation exposure modulates mitophagy in embryonic cells of freshwater prawn <i>Macrobrachium olfersii</i> : Exploring a protective organelle quality control mechanism.....	49
5. CAPÍTULO 2	50
5.1. Contextualização	50
5.1.1. Objetivos específicos da tese contemplados no artigo.....	50
5.1.2. Hipóteses da tese contempladas no artigo.....	50
5.1.3. Materiais e métodos da tese contempladas no artigo	51
5.2. Artigo: A exposição à radiação UVB induz alterações na morfologia externa, nos eventos celulares e no comportamento das larvas do camarão de água doce <i>Macrobrachium olfersii</i>	51
6. CONCLUSÕES DA TESE	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

APRESENTAÇÃO DA TESE

Os comprimentos de onda da radiação ultravioleta B (UVB) alcançam a superfície terrestre, afetando também os ecossistemas aquáticos e os organismos que ali vivem e se reproduzem. *Macrobrachium olfersii*, um camarão de água doce envolvido na ciclagem de energia dos ambientes aquáticos, habita e se reproduz em águas claras e rasas, estando assim exposto à radiação UVB. Estudos já demonstraram que essa radiação, além de induzir a formação de dímeros de timina na molécula de DNA, compromete o ciclo celular e ativa a apoptose, também pode alterar a dinâmica mitocondrial das células embrionárias de *M. olfersii*, aumentando a fissão e diminuindo a fusão mitocondrial. Essa alteração na dinâmica mitocondrial é um importante indicador de mitofagia, a qual consiste em um mecanismo de controle de qualidade de mitocôndrias, através da degradação de organelas danificadas. Assim, durante o mestrado e o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD), caracterizamos os genes que codificam as proteínas envolvidas na ativação da mitofagia, demonstrando inclusive que esse mecanismo é inerente ao desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*. Também, demonstramos a cronologia dos genes e proteínas envolvidas na mitofagia após a exposição dos embriões à UVB. Além disso, expandimos o foco da pesquisa para além dos embriões, abrangendo o desenvolvimento larval em resposta à exposição à UVB, investigando as alterações na morfologia, índice do olho, comportamento, proliferação celular e ativação da apoptose e mitofagia. O objetivo desta tese foi avaliar os efeitos da radiação UVB na indução à mitofagia nas células embrionárias e larvais de *M. olfersii*, bem como analisar as alterações morfológicas, comportamentais e respostas celulares associadas ao dano ao DNA, apoptose e proliferação celular nas células larvais. Apresentamos ainda a seção de materiais e métodos utilizados e dois capítulos, que são organizados com base nos resultados do período do doutorado. O primeiro artigo já publicado, aborda a expressão gênica e conteúdo protéico envolvidos na ativação da mitofagia nas células embrionárias frente a exposição à UVB, também demonstra que a mitofagia é inerente ao desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*. O segundo artigo aborda as alterações morfológicas externas, comportamentais e no índice do olho, além das respostas celulares, como dano ao DNA, indução da apoptose, diminuição da proliferação celular e ativação da mitofagia nas células larvais.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) abrange comprimentos de onda entre 200 e 400 nanômetros, situando-se entre a luz visível e os raios-X no espectro eletromagnético da luz solar. Essa radiação UV é subdividida em três categorias principais: UVC (200 – 290 nanômetros), UVB (290 – 320 nanômetros) e UVA (320 – 400 nanômetros) (Figura 1) (Crutzen, 1974; Diffey, 1991 e 2002).

A radiação UVC, devido aos seus comprimentos de onda curtos e alta energia, é completamente atenuada na camada de ozônio, não alcançando a superfície terrestre (Kerr e Fioletov, 2007; Williamson *et al.*, 2014). Por sua vez, a radiação UVB apresenta tanto comprimentos de onda curtos, os quais são inteiramente atenuados na camada de ozônio, quanto comprimentos de onda longos, que, devido à sua baixa energia, não são efetivamente atenuados e conseguem atingir a superfície terrestre (Kerr e Fioletov, 2007; Williamson *et al.*, 2014). Os comprimentos de onda da radiação UVA, por serem comprimentos de onda longos com baixa energia, também não são atenuados na camada de ozônio (Kerr e Fioletov, 2007; Williamson *et al.*, 2014) (Figura 1).

A atenuação dos comprimentos de onda da radiação ultravioleta na camada de ozônio é realizada através da dinâmica de formação e dissociação do ozônio (Rowland, 1991). Essa dinâmica envolve a formação do gás ozônio (O_3), constituído por um átomo livre de oxigênio (O) e uma molécula de oxigênio (O_2), e requer a energia dos comprimentos de ondas curtos da radiação UVC e da UVB (Figura 2A) (Kirchhoff, 1988). A correta dinâmica de formação e dissociação do O_3 desempenha um papel crucial na proteção da superfície terrestre contra os efeitos nocivos dos diferentes comprimentos de onda da radiação UV (Powell *et al.*, 2017).

Em 1995, os químicos Crutzen, Molina e Rowland foram laureados com o Prêmio Nobel em Química pelos seus trabalhos relacionados à química atmosférica, envolvendo a formação e decomposição do ozônio (Bancroft *et al.*, 2007; Crutzen, 1974; Molina e Rowland, 1974). Os trabalhos demonstraram que a camada de ozônio pode apresentar alterações devido à emissão de poluentes como bromofluorocarbonos (BFC) e clorofluorocarbonos (CFC), os quais acumulam na atmosfera, contribuindo para a redução do O_3 (Crutzen, 1974; Molina e Rowland, 1974). Na estratosfera, a radiação UV também é capaz de dissociar esses compostos (BFC e CFC), liberando moléculas de bromo (Br), flúor (F) e cloro (Cl). Através de

reações fotoquímicas, essas moléculas de Br, F e Cl, ligam-se aos átomos livres de O, comprometendo assim a dinâmica da formação da camada de ozônio, tornando-a rarefeita (Crutzen, 1974; Molina e Rowland, 1974) (Figura 2B).

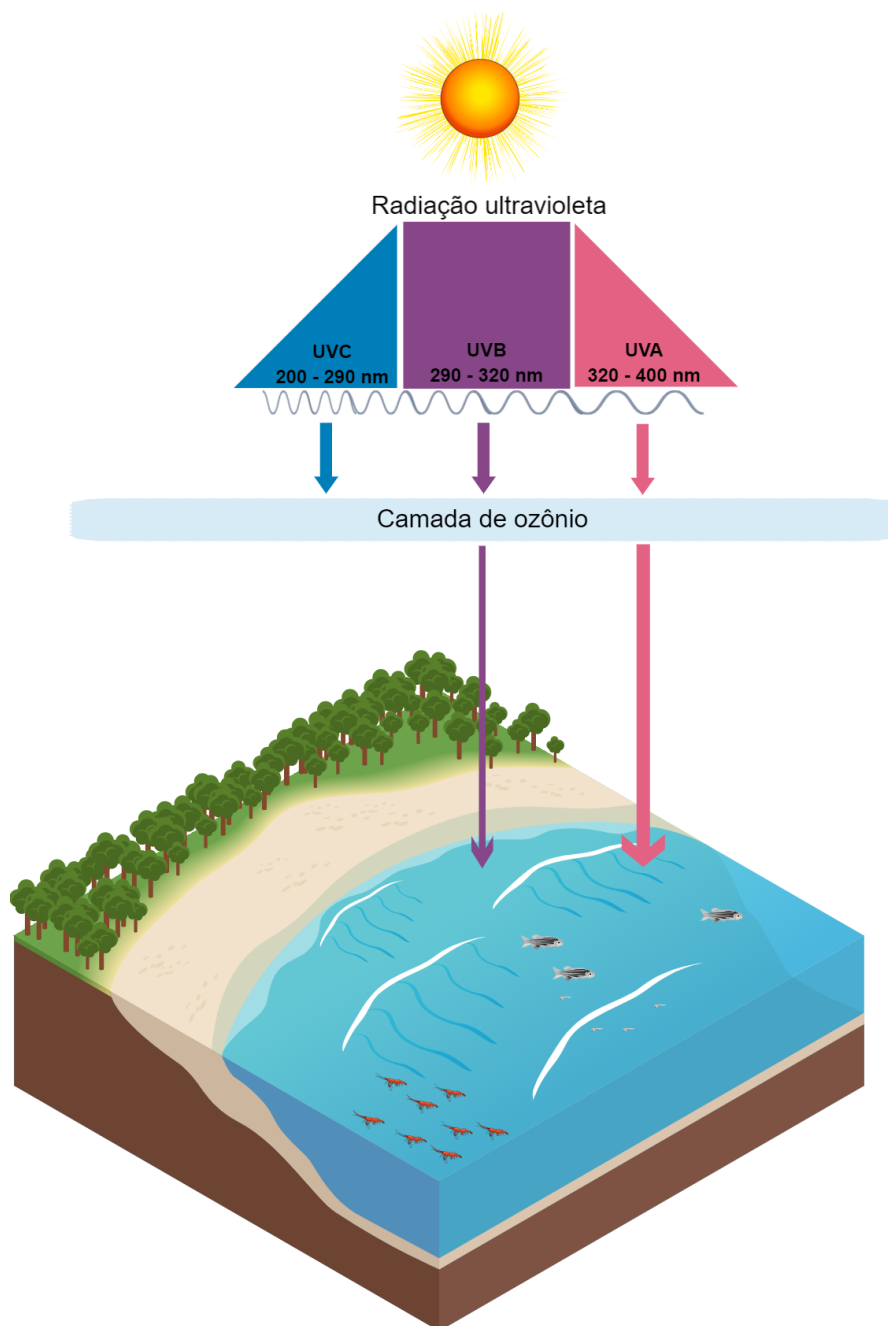


Figura 1. Representação esquemática dos comprimentos de onda da radiação ultravioleta e a incidência dessa radiação na superfície terrestre, controlada pela camada de ozônio estratosférico.

UVA: radiação ultravioleta A; UVB: radiação ultravioleta B; UVC: radiação ultravioleta C. As setas representam os comprimentos de onda da radiação UVA (seta rosa), UVB (seta roxa) e UVC (seta azul). Fonte: da autora (2024).

Baseados nos estudos de Crutzen, Molina e Rowland, na década de 1980 foi descoberta o então denominado “buraco de ozônio antártico”, caracterizado pela significativa redução da camada de ozônio (Farman *et al.*, 1985; Kirchhoff, 1988). A camada de ozônio se torna mais rarefeita, pois em algumas regiões do planeta são liberados na atmosfera maiores concentrações de CFC e BFC (Tiwari e Agrawal, 2018). Em 1987, na Convenção de Viena, foi criado o Protocolo de Montreal sobre as Substâncias que Destroem a Camada de Ozônio, tratado internacional que entrou em vigor em 1 de janeiro de 1989 (Montreal Protocol, 1987). O Protocolo de Montreal impõe obrigações específicas, em especial à progressiva redução da produção e consumo das substâncias que destroem a camada de ozônio, como CFC e BFC (Farman *et al.*, 1985; Kirchhoff, 1988; Velders *et al.*, 2007).

Trabalhos recentes demonstraram que a redução na liberação das substâncias que destroem a camada de ozônio teve impacto positivo na recuperação de menos que 4% por década na camada de ozônio nos últimos 25 anos, aumentando em alguns lugares do planeta e diminuindo em outros (Bernhard *et al.*, 2023; Chipperfield *et al.*, 2020; Fang *et al.*, 2019; Mäder *et al.*, 2010; Weatherhead e Andersen, 2006). A camada de ozônio ainda não está totalmente recuperada, o que significa que níveis elevados de radiação UVB continuam a atingir a superfície terrestre e impactar os organismos vivos (Williamson *et al.*, 2019).

É crucial destacar que os comprimentos de onda da radiação UVA e UVB desempenham papéis biológicos importantes, incluindo sua participação fundamental na fotossíntese, na síntese de vitamina D em humanos e na orientação visual de aves, peixes e artrópodes (Bennett e Cuthill, 1994; Bouillon *et al.*, 1998; Losey *et al.*, 1999; Ljubic *et al.*, 2021; Middleton e Teramura, 1994; Neville *et al.*, 2021; Penacchio *et al.*, 2015; Vergneau-Grosset e Péron, 2020). No entanto, a exposição a esses comprimentos de onda da UVA e UVB, dependendo da dose recebida, podem resultar em danos celulares e moleculares (Bancroft *et al.*, 2007; Nazari *et al.*, 2010). Esses processos deletérios podem alterar a produtividade dos ecossistemas, afetando a diversidade de espécies, as interações tróficas e os ciclos biogeoquímicos globais (Núñez-Pons *et al.*, 2018; Williamson *et al.*, 2019).

Em humanos, os danos causados pela radiação UVB são bem conhecidos, incluindo o desenvolvimento de câncer de pele, catarata e envelhecimento precoce (MacKie, 2000; Neale *et al.*, 2023; Polefka *et al.*, 2011; Stary *et al.*, 1997). Além disso,

o comprometimento na dinâmica da camada de ozônio está diretamente relacionado ao aumento dos níveis de radiação UVB na superfície terrestre, potencialmente expondo os organismos a doses mais elevadas dessa radiação (Bernhard *et al.*, 2023).

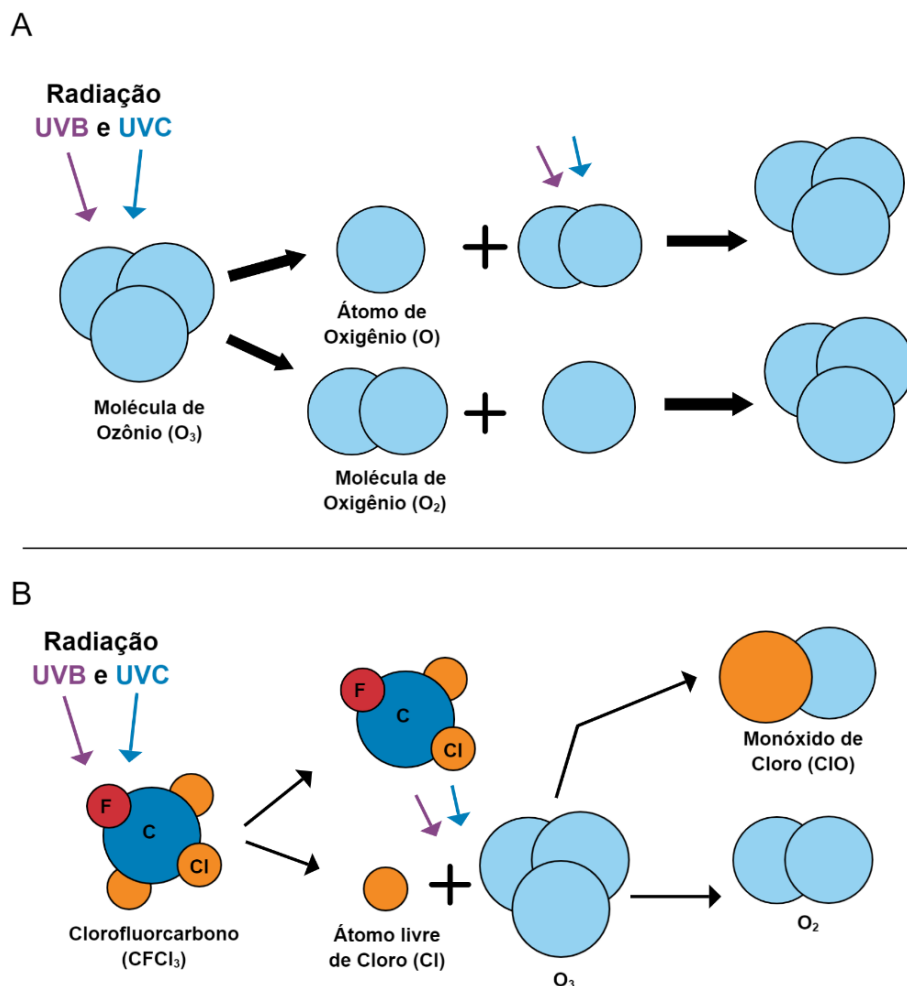


Figura 2. Representação esquemática da formação e dissociação do ozônio. Os comprimentos de onda das radiações UVB e UVC estão envolvidas em reações fotoquímicas que resultam na dissociação da molécula de ozônio em um átomo livre de oxigênio e uma molécula de oxigênio. Subsequentemente, cada átomo livre de oxigênio reage com uma molécula de oxigênio, formando novamente a molécula de ozônio (A). Os comprimentos de onda das radiações UVB e UVC, através de reações fotoquímicas, promovem a liberação de átomos de cloro das moléculas de clorofluorcarbonos. Esses átomos de cloro reagem com átomos de oxigênio, resultando na formação de novos compostos químicos, como o monóxido de cloro (B). UVB: radiação ultravioleta B; UVC: radiação ultravioleta C. As setas representam os comprimentos de onda da radiação UVB (seta roxa) e UVC (seta azul). Fonte: baseado em Diffey (1991) e Molina e Rowland (1974).

1.2. Efeitos da radiação ultravioleta em organismos aquáticos

Os ecossistemas aquáticos absorvem uma quantidade de dióxido de carbono atmosférico semelhante aos ecossistemas terrestres, produzem metade da biomassa do planeta, são a principal fonte de suprimentos de comida e água potável, e possuem grande importância econômica para as indústrias farmacêutica, química e alimentícia (Häder *et al.*, 2011; Prakash, 2021). Os comprimentos de onda da radiação UVB alcançam ambientes aquáticos, e a profundidade que essa radiação penetra é influenciada por vários fatores ambientais, como a concentração de matéria orgânica dissolvida (MOD), a quantidade de fitoplâncton, a salinidade e a refletividade da superfície (Bancroft *et al.*, 2007). Em comparação com ambientes marinhos, corpos d'água doce como lagos e rios geralmente contêm maiores quantidades de MOD, provenientes dos ecossistemas terrestres circundantes. Estudos indicam que a MOD desempenha um papel crucial na atenuação da radiação UVB em ambientes aquáticos e limitando sua penetração na coluna de água (Clair e Sayer, 1997; Williamson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

A fim de evitar e mitigar os danos induzidos pela radiação UVB, muitos organismos desenvolveram estratégias adaptativas. Algumas dessas estratégias incluem barreiras físicas protetoras como conchas calcificadas que minimizam a exposição aos raios UV em moluscos, e os espinhos dos equinodermos (Núñez-Pons *et al.*, 2018), outros desenvolveram comportamentos evasivos, como a atividade noturna observada em certas espécies de anfíbios (Blaustein e Belden, 2003). Ao nível celular, muitos crustáceos possuem cromatóforos, células pigmentadas que podem expandir-se ou contrair-se para alterar a cor e a reflexividade, atenuando a radiação incidente (Auerswald *et al.*, 2008; Fingerman, 1965), algumas espécies de vertebrados e invertebrados produzem enzimas como a fotolíase, que repara o dano ao DNA induzido pela energia da UVB (Kobayashi *et al.*, 2001; Zeni *et al.*, 2015). Essas adaptações são vitais para a sobrevivência em ambientes nos quais os organismos estão expostos a intensidades variáveis de radiação UVB, permitindo que mantenham suas funções biológicas essenciais (Núñez-Pons *et al.*, 2018).

Apesar de desenvolverem diversas respostas e estratégias de defesa, essas medidas proporcionam uma proteção incompleta aos organismos aquáticos expostos à radiação UVB (Bancroft *et al.*, 2007). Os comprimentos de onda da UVB representam um estressor crítico para uma vasta gama de organismos aquáticos,

incluindo zooplâncton, corais, crustáceos, peixes e anfíbios (Alves e Agustí, 2020; Gouveia *et al.*, 2005; Lundsgaard *et al.*, 2020; Müller *et al.*, 2020; Overmans e Agustí, 2023; Shick *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1994). Os danos induzidos nesses diferentes animais estão relacionados com o comportamento/localização do organismo dentro da coluna de água, pelas características ópticas (ou seja, transmitância de UVB) do corpo de água, e o tempo de exposição (Tedetti e Sempéré, 2006; Wang *et al.*, 2019; Williamson *et al.*, 2007).

No núcleo celular, a radiação UVB tem capacidade de induzir dano à molécula de DNA através da formação de dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD) e 6–4 fotoprodutos que, caso não reparados, podem comprometer processos celulares como transcrição e tradução, afetando a proliferação celular e induzindo apoptose (Häder e Sinha, 2005; Schramm *et al.*, 2017; Zeni *et al.*, 2015). No citoplasma, a radiação UVB pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), ocasionando peroxidação lipídica e alterando a permeabilidade celular e funcionamento de organelas membranosas (Kim *et al.*, 2015; Obermüller *et al.*, 2005; Quadros *et al.*, 2016).

A exposição à radiação UVB afeta vertebrados e invertebrados em diferentes estágios de vida, desde adultos até larvas e embriões. Adultos e juvenis de diversas espécies aquáticas podem apresentar redução na fecundidade, alterações na pele, comprometimento do sistema imunológico, diminuição da sobrevivência e alterações comportamentais (Alves *et al.*, 2020 e 2021; Salo *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2009). E embriões expostos à radiação UVB apresentam alterações no ritmo do desenvolvimento embrionário as quais podem comprometer a viabilidade desses organismos (Bancroft *et al.*, 2007; Cockell e Knowland, 1999; Nazari *et al.*, 2013).

Há uma premissa em estudos de embriotoxicidade que estabelece que embriões são mais suscetíveis a estressores ambientais do que larvas e adultos (Bancroft *et al.*, 2007; Epel *et al.*, 1999; Zagarese e Williamson, 2001). Essa maior suscetibilidade ocorre devido ao desenvolvimento incompleto dos sistemas de defesa (Zagarese e Williamson, 2001), como pigmentos e compostos do tipo micosporinas e aminoácidos tipo micosporinas, que possuem atividade antioxidante e são capazes de absorver radiações UV (Carreto e Carignan, 2011; Hovel e Morgan, 1999; Zhang *et al.*, 2022).

Em embriões de peixes, a exposição à radiação UVB levou à diminuição na sobrevivência, alterações morfológicas e perda da migração vertical na coluna d'água

(Araújo *et al.*, 2021; Pasparakis *et al.*, 2019). Em embriões de anfíbios, a exposição induziu alterações morfológicas que resultaram no aumento da mortalidade dos embriões e, conseqüentemente, na diminuição da taxa de eclosão (Blaustein *et al.*, 1997; Habaeva *et al.*, 2020; Licht, 2003).

Dentre os invertebrados aquáticos, se destacam trabalhos com moluscos, apresentando aumento na mortalidade, atraso no desenvolvimento embrionário e larval dos organismos expostos à UVB (Molina-Carrillo *et al.*, 2023; Ruelas *et al.*, 2006). Em embriões e larvas de ouriços-do-mar, os efeitos da exposição à radiação UVB induziu alterações morfológicas e fisiológicas, danos ao DNA, estresse celular e alterações na transcrição e tradução de proteínas envolvidas na apoptose (Bonaventura e Matranga, 2017; Russo *et al.*, 2014).

Em embriões de camarão de água doce, *Macrobrachium olfersii*, expostos à radiação UVB, observou-se uma significativa redução na proliferação celular, evidenciando a sensibilidade desses organismos à radiação UVB (Nazari *et al.*, 2010; Zeni *et al.*, 2015). Além disso, a exposição à radiação UVB resultou em danos diretos ao DNA, caracterizados pela formação de dímeros de pirimidina, além de induzir atraso e interrupção no ciclo celular (Zeni *et al.*, 2015). Estes efeitos foram acompanhados por uma diminuição na taxa de proliferação celular, aumento na incidência de células em apoptose e mudanças na dinâmica mitocondrial (Quadros *et al.*, 2016; Schramm *et al.*, 2017; Zeni *et al.*, 2015).

1.3. Eventos celulares inerentes ao desenvolvimento

Eventos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e mitofagia são processos inerentes ao desenvolvimento embrionário e larval (Brill *et al.*, 1999; Mishra e Chan, 2014; Sadler, 2021; Yildirim e Seli, 2024). Esses eventos desempenham papéis cruciais durante as fases de desenvolvimento de diferentes organismos, garantindo a formação adequada e a funcionalidade dos tecidos e órgãos (Brill *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2000; Mishra e Chan, 2014; Voss e Strasser, 2020).

A proliferação e diferenciação celular são processos essenciais durante o desenvolvimento embrionário, assegurando a formação funcional de todos os tecidos e órgãos dos seres vivos (Masui e Wang, 1998; Plickert *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 2021). A proliferação permite o aumento no número de células e o crescimento dos tecidos de maneira coordenada e controlada (Morris-Kay e Sokolova, 1996; Sadler, 2021;

Zhu e Zernicka-Goetz, 2020). Por outro lado, a diferenciação celular orienta as células proliferativas a adotarem funções específicas e características morfológicas distintas (Li e Kirschner, 2014; Morriss-Kay e Sokolova, 1996; Sadler, 2021). Um importante marcador celular de proliferação é a Fosfo-histona H3 (PHH3), uma vez que a histona H3 fosforilada desempenha um papel fundamental na condensação da cromatina durante a divisão celular (Polo e Almouzni, 2005).

Da mesma forma, a apoptose, um tipo de morte celular programada, é igualmente fundamental para o funcionamento adequado do organismo e necessária para o desenvolvimento embrionário (Lodish *et al.*, 2014; Meier *et al.*, 2000). Durante o desenvolvimento, a apoptose desempenha papéis cruciais, como eliminação do excesso de células durante a remodelação de tecidos e órgãos, manutenção do número ideal de células e remoção de células danificadas (Lodish *et al.*, 2014; Twomey e McCarthy, 2005).

A apoptose é desencadeada por duas principais vias de sinalização e regulada por ligantes extrínsecos e intrínsecos, coordenada pela participação de proteínas denominadas de caspases (Hongmei, 2012). A via intrínseca pode ser ativada através do dano ao DNA ou a partir da formação de ERO, levando à alteração do potencial de membrana mitocondrial (Hongmei, 2012; Inoue *et al.*, 2009). Com a alteração do potencial de membrana, ocorre a liberação de citocromo c do espaço intermembranoso da mitocondria para o citosol, desencadeando a ativação das proteínas caspase9 e caspase3 (Lodish *et al.*, 2014; Wu e Bratton, 2013). Por outro lado, a via extrínseca, após ativação do receptor transmembrana, promove a transdução de sinal ao citoplasma ativando caspases iniciadoras, que termina com a ativação da caspase3 (Hongmei, 2012; Lodish *et al.*, 2014). Tanto a via intrínseca quanto a extrínseca compartilham a ativação da caspase3, uma proteína efetora da apoptose que desencadeia a sinalização para que outras proteínas promovam a fragmentação do DNA, resultando na formação de corpos apoptóticos (Hail *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2021).

Entre os eventos celulares inerente do desenvolvimento, pode-se destacar a mitofagia, um processo autofágico que envolve a degradação de mitocondrias e é frequentemente descrito como um mecanismo de controle de qualidade mitocondrial (Tolkovsky, 2009; Youle e Narendra, 2011). Esse processo mitofágico inclui uma série

de eventos que envolvem a detecção de mitocôndrias danificadas, recrutamento do fagócito e degradação através da ação do autofagolisossomo (Onishi *et al.*, 2021).

Embora a mitofagia seja relatada na literatura como um evento de degradação de mitocôndrias danificadas (Onishi *et al.*, 2021; Tolkovsky, 2009; Youle e Narendra, 2011), também tem sido demonstrada a ativação em células embrionárias com o objetivo de diferenciação celular e tecidual durante o desenvolvimento (Mishra e Chan, 2014; Palikaras *et al.*, 2018). A mitofagia, portanto, é um processo celular inerente ao desenvolvimento embrionário e larval de diversas espécies animais, incluindo invertebrados aquáticos e roedores (Al Rawi *et al.*, 2011; Galasso *et al.*, 2019; Palikaras *et al.*, 2018; Strücker *et al.*, 2024).

Existem várias vias de sinalização para a ativação da mitofagia, sendo a mais estudada a via PINK1-Parkin. Em mitocôndrias funcionais, a PINK1 (PTEN-induced kinase 1, codificada pelo gene *Pink1*) é constantemente translocada para a mitocôndria, onde reconhece a proteína TOM20, presente na membrana mitocondrial externa (translocase of outer mitochondrial membrane 20, codificada pelo gene *Tomm20*) (Eldeeb *et al.*, 2024). A proteína PINK1, reconhecida pela TOM20 é então clivada pela protease PARL (PINK1/PGAM5-associated rhomboid-like protease) (Deas *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 2013). PINK1 clivada é subsequentemente retrotranslocada para o citosol e degradada através da ação do proteassoma (Maruszczak *et al.*, 2022; Matsuda *et al.*, 2013). A proteína OPA1 (Dynamin-like GTPase optic atrophy 1, codificada pelo gene *Opa1*), é uma proteína localizada na membrana mitocondrial interna e no espaço intermembranoso e tem atividade tanto na fissão quanto na fusão da membrana mitocondrial interna (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021).

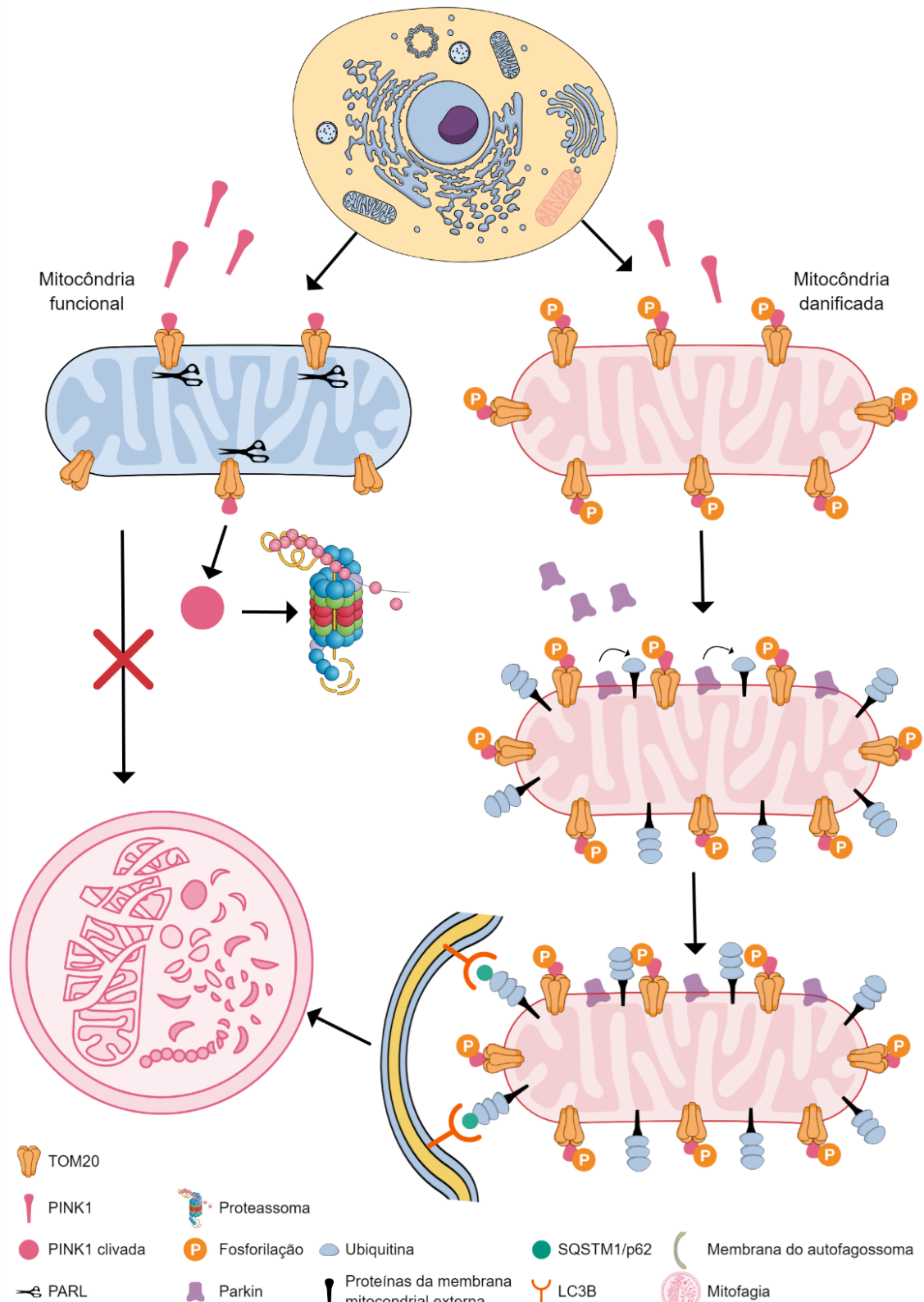


Figura 3. Representação esquemática do processo mitofágico, demonstrando a localização e integração das proteínas e organelas envolvidas no controle de qualidade mitocondrial.

LC3B: Microtubule-associated proteins 1 light chain 3 beta; PARL: Mitochondrial intramembrane cleaving protease; Parkin: RBR E3 ubiquitina protein ligase; PINK1: PTEN-induced kinase 1; SQSTM1: Sequestosome 1; TOM20: Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20. Fonte: adaptado de Hamacher-Brady e Brady (2016).

Em mitocôndrias danificadas, PINK1 acumula na membrana mitocondrial externa, onde é autofosforilada, recrutando e ativando Parkin (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase, codificada pelo gene *Prkn*) (Onishi *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). A Parkin ativada adiciona cadeias de ubiquitina em várias proteínas da membrana mitocondrial externa (Seirafi *et al.*, 2015). Posteriormente, as cadeias de ubiquitinas são reconhecidas por proteínas adaptadoras LC3B, como a p62 (sequestosome 1, codificada pelo gene *SQSTM1*) (Onishi *et al.*, 2021). A proteína LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, codificada pelo gene *MAP1LC3*), está localizada na membrana do autofagossoma e reconhece as proteínas adaptadoras (Bjørkøy *et al.*, 2009). Com o reconhecimento das proteínas listadas acima, a mitocôndria a ser degradada é identificada pela membrana do autofagossoma (Onishi *et al.*, 2021). A Figura 3 sumariza as principais proteínas envolvidas no controle de qualidade mitocondrial, pela ativação da mitofagia.

Embora a proliferação, diferenciação, apoptose e mitofagia sejam processos essenciais para o desenvolvimento normal dos seres vivos, a exposição à radiação UVB pode alterar significativamente a dinâmica desses eventos celulares, resultando em impactos adversos no desenvolvimento (Alves e Augusti, 2020; Dahms e Lee, 2010; Wiegand *et al.*, 2004).

1.4. Modelo biológico de estudo

M. olfersii (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae), é um camarão de água doce que vive e se reproduz em águas claras e rasas (Nazari *et al.*, 2013; Rossi e Mantelatto, 2013). As espécies do gênero *Macrobrachium* apresentam ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América (Dugger e Dobkin, 1975; Holthuis, 1952). *M. olfersii* é uma espécie que desempenha importante papel na ciclagem de energia dos ambientes aquáticos, sendo a mais abundante na Ilha de Santa Catarina (Ammar *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 1999). As fêmeas dessa espécie carregam em torno 1.500 ovos em uma câmara incubadora externa não recoberta por carapaça ventral, até a eclosão em larvas livres e natantes (Müller *et al.*, 2004; Nazari *et al.*, 2003; Simões-Costa *et al.*, 2005) (Figura 4A).

O desenvolvimento de *M. olfersii* ocorre em 14 dias, em condições de temperatura a 24 °C (± 1 °C) (Müller *et al.*, 2004; Simões-Costa *et al.*, 2005). Os ovos são do tipo centrolécitos, apresentando grande quantidade de vitelo, o que direciona a clivagem

meroblástica superficial e o desenvolvimento do embrião na superfície do ovo (Müller *et al.*, 2004). Além das características mencionadas sobre o desenvolvimento, é crucial destacar que as células embrionárias são transparentes. A transparência celular e a disposição superficial do embrião, facilitam a observação das mudanças morfológicas que ocorrem ao longo dos estágios embrionários (Müller *et al.*, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário, ocorrem uma série de eventos cruciais os quais foram descritos por Simões-Costa *et al.* (2005), em dias embrionário (E). Algumas das características mais importantes são descritas a seguir: No dia embrionário E1, inicia-se a clivagem, que delimita os primeiros planos de divisão na superfície do ovo, formando os blastômeros. Em E3, ocorre a gastrulação, marcada pela organização do disco germinativo em forma de "V" e pela diferenciação dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). Em E4, observa-se a formação do nauplius embrionizado (larva básica dos crustáceos que permanece retida no ovo). Neste estágio, é possível visualizar o esboço dos lobos ópticos, os três pares de apêndices naupliares (antênula, antena e mandíbula), o estomodeu e o início da formação da papila caudal.

Em E5, o nauplius organiza-se superficialmente, com o crescimento dos lobos ópticos e da papila caudal. A papila caudal atinge a extremidade inferior do ovo, caracterizando a organização inicial do pós-nauplius embrionizado, com a maior parte do ovo ainda ocupada pela massa de vitelo. No dia E6, os lobos ópticos expandem-se cefálica e lateralmente, tornando-se mais arredondados. A papila caudal encurva-se, acompanhando superficialmente o formato do ovo, e começa a crescer em direção aos lobos ópticos. Nesse dia, inicia-se a formação e organização do abdômen.

Na metade do desenvolvimento embrionário, o dia E7, marca a fase de pós-nauplius embrionizado intermediário. Nesse estágio do desenvolvimento pode-se observar o início da formação do olho na porção distal do lobo óptico, acompanhado por cromatóforos avermelhados próximos à região pigmentada do olho (Figura 4B).

Em E8, os lobos ópticos são evidentes na região anterior do pós-nauplius, ocorre um aumento na região pigmentada do olho, que assume a forma elíptica. Em E9, o olho apresenta grande aumento, sendo possível a observação de omatídeos. A extremidade distal da papila caudal aproxima-se da região anterior do embrião, sobre os lobos ópticos. Em E8 e E9, O embrião apresenta movimentos aleatórios e batimentos cardíacos irregulares.

Ao atingir E10, ainda no período pós-nauplius embrionizado intermediário, os contornos do lobo óptico se tornam mais definidos, e há o início da segmentação da papila caudal, contribuindo para a formação do abdômen. Além disso, é neste estágio que se inicia a movimentação dos apêndices torácicos e da papila caudal. Em E11, E12 e E13, o olho cresce significativamente e ocupa grande parte do lobo óptico, o corpo do embrião se expande lateralmente, os batimentos cardíacos se tornam rítmicos, e o embrião apresenta movimentos corporais frequentes.

No último dia, E14, chega-se ao estágio de pós-nauplius embrionizado final. Nesse estágio, os olhos adquirem um formato arredondado, ocupando grande parte dos lobos ópticos, e os apêndices apresentam movimentos coordenados. A carapaça dorsal está completamente formada e a curvatura da papila caudal recobre os lobos ópticos. As mudanças significativas nesse estágio estão relacionadas ao desenvolvimento final dos sistemas orgânicos, preparando-os para sua funcionalidade após a eclosão (Simões-Costa *et al.*, 2005).

As larvas dessa espécie passam por 12 estágios do tipo zoea antes de alcançarem a fase juvenil (Dugger e Dobkin, 1975). As larvas zoea I (L1) de *M. olfersii* apresentam uma divisão clara do corpo em cefalotórax e abdômen (Figura 4C e D). O cefalotórax, é a região onde se encontram os olhos e os apêndices cefalotorácicos. Os olhos das larvas Zoea I estão aderidos à carapaça. A partir da Zoea II, os olhos tornam-se pedunculados (Dugger e Dobkin, 1975). Os apêndices cefalotorácicos são protegidos por uma carapaça que envolve todos os apêndices, além de um rostro pequeno levemente curvado para baixo. Os apêndices cefalotorácicos consistem em um par de antenas e antênulas, que funcionam como receptores de estímulos ambientais, seguidos pela mandíbula, maxila, três maxilípedes (que auxiliam na alimentação) e pereópodes (importantes para a locomoção), todos eles apresentando ramificações. O abdômen é composto por seis segmentos sem apêndices, e o télson se estende a partir do sexto segmento, enquanto os urópodes ainda não estão desenvolvidos (Dugger e Dobkin, 1975).

Os embriões e larvas de *M. olfersii* destacam-se como um modelo de estudo adequado para pesquisas em laboratório, especialmente para investigar os efeitos da radiação UVB. Eles possuem diversas características que os tornam excelentes candidatos para estudos, tais como: adaptabilidade notável a ambientes controlados, permitindo a obtenção de fêmeas ovígeras e acompanhamento do desenvolvimento

embrionário até a eclosão em larvas; carapaça transparente que envolve o corpo das fêmeas, exceto na região ventral, facilitando o acesso aos embriões, pois as fêmeas os transportam em uma câmara incubadora externa; células embrionárias e larvais transparentes; alta taxa de produção de ovos e um desenvolvimento relativamente rápido (apenas 14 dias); as fêmeas realizam movimentos frequentes de aeração, movimentando os ovos e expondo-os à radiação UVB incidente; as larvas apresentam comportamento de fototropismo positivo, estando expostas à radiação UVB; além disso, o período reprodutivo da espécie ocorre durante os meses de verão, quando os níveis de radiação UVB atingem seu pico na região da Ilha de Santa Catarina. Essas características combinadas tornam os embriões e larvas de *M. offersii* excelentes modelos experimentais para investigar os efeitos da radiação UVB no desenvolvimento embrionário e larval.

Pesquisas anteriores conduzidas no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) destacaram as mitocôndrias das células embrionárias de *M. offersii* como alvo importante da radiação UVB. Foi demonstrada a produção de ERO concomitantemente à perda das cristas mitocondriais, rupturas nas membranas mitocondriais externas e alterações nas proteínas associadas aos processos de fusão e fissão mitocondrial (Quadros *et al.*, 2016). Esses resultados ressaltam que as mitocôndrias são alvos primários da UVB, o que implica em potenciais efeitos adversos nos processos metabólicos e energéticos das células embrionárias, podendo influenciar diretamente o desenvolvimento e a viabilidade desses organismos.

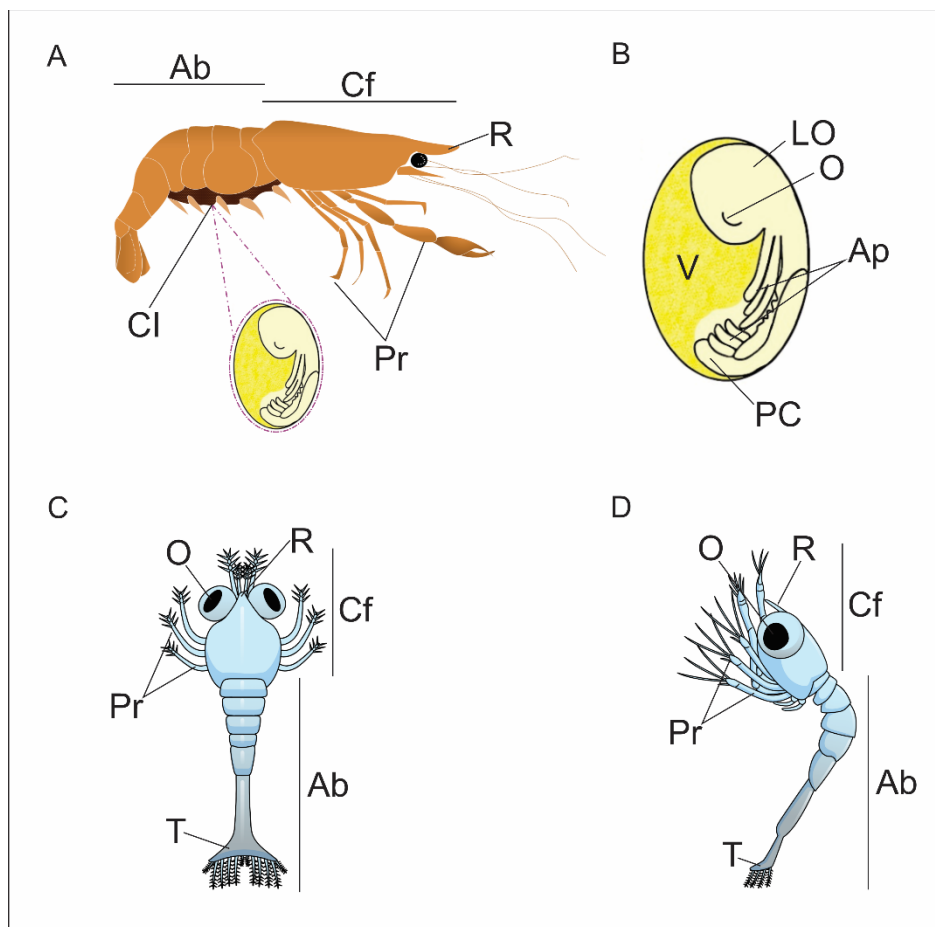


Figura 4. Representação esquemática da morfologia externa de fêmea adulta, embrião e larva de *Macrobrachium olfersii*. Fêmea adulta com embriões na câmara incubadora, vista lateral (A). Embrião no 7º dia embrionário, vista lateral (B). Zoea no 1º dia larval, vista dorsal (C). Zoea no 1º dia larval, vista lateral (D).

Ab: abdômen; Ap: apêndices; Cf: cefalotórax; Cl: câmara incubadora; LO: lobo óptico; O: olho; PC: papila caudal; Pr: pereópode; R: rostro; T: télson; V: vitelo. Fonte: da autora (2024).

Diante do panorama apresentado e considerando: (i) a incidência da radiação UVB nos ambientes aquáticos, (ii) a importância biológica de *M. olfersii* na ciclagem de energia desses ambientes (iii), a obtenção dos dados da análise transcriptômica de embriões de *M. olfersii* (Jaramillo *et al.*, 2016), a qual viabiliza estudos em biologia do desenvolvimento e (iv) a escassez de estudos dos efeitos da radiação UVB sobre as respostas mitocondriais nas células embrionárias e larvais, o presente trabalho teve como foco analisar os efeitos da radiação UVB na ativação da mitofagia durante o desenvolvimento embrionário e larval de *M. olfersii*. Desse modo, a partir dos conhecimentos atuais sobre os efeitos biológicos da radiação UVB, as seguintes hipóteses científicas foram estabelecidas: (i) os genes de *M. olfersii* que codificam proteínas envolvidas na mitofagia são evolutivamente conservados, (ii) a mitofagia é um evento inerente ao desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*, (iii) a exposição à

radiação UVB induz a superexpressão de genes e proteínas envolvidas no processo mitofágico nas células embrionárias de *M. olfersii*, (iv) a exposição à radiação UVB induz a superexpressão de proteínas envolvidas no processo mitofágico nas células larvais de *M. olfersii*, (v) as células larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB apresentam dano ao DNA, através da formação de dímeros de timina, (vi) as larvas de *M. olfersii* expostas à UVB apresentam diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose, (vii) as larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB apresentam alterações morfológicas, (viii) a exposição à radiação UVB compromete o desempenho larval de *M. olfersii*.

2. OBJETIVOS DA TESE

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da radiação UVB na indução à mitofagia nas células embrionárias e larvais de *M. olfersii*, bem como analisar as alterações morfológicas, comportamentais e respostas celulares associadas ao dano ao DNA, apoptose e proliferação celular nas células larvais.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar *in silico* as sequências codificantes dos genes *Tomm20* e *Opa1*, relacionados a transcrição e tradução de proteínas das membranas mitocondriais externa e interna, respectivamente, a partir da análise do transcriptoma dos embriões de *M. olfersii*;

- Identificar e caracterizar *in silico* as sequências codificantes dos genes *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Pink1*, *Prkn*, associados ao processo de mitofagia, a partir da análise do transcriptoma dos embriões de *M. olfersii*;

- Determinar a relação filogenética entre espécies de crustáceos, das sequências codificantes dos genes *Tomm20*, *Opa1*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Pink1* e *Prkn*, associados ao processo de mitofagia dos embriões de *M. olfersii*;

- Avaliar em diferentes estágios do desenvolvimento de *M. olfersii* e em embriões expostos à radiação UVB, os níveis de transcritos dos genes *Tomm20*, *OPA1*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Pink1*, *Prkn*, associados a mitofagia;

- Imunolocalizar e quantificar as células positivas para as proteínas TOM20, PINK1, p62 e LC3B, em células embrionárias e larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB;

- Imunolocalizar e quantificar as células positivas para dímeros de timina, caspase3 e PHH3 em células larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB;

- Analisar a morfologia externa das larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB, avaliando o comprimento corporal, índice do olho e transparência celular;

- Avaliar o desempenho larval através da análise do comportamento de fototropismo positivo de *M. olfersii* expostos à radiação UVB.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta dos animais e obtenção dos embriões e larvas

Exemplares adultos de camarões de água doce de *M. olfersii* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Florianópolis, Ilha de Santa Catarina, Brasil (25° 35' S, 48° 35' W) e transportados em aquários portáteis para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) – Centro de Ciências Biológicas (CCB) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Em laboratório, os camarões foram mantidos em aquários de 60 L com aeração constante, temperatura de 24 °C (± 1) e em condições de fotoperíodo de 12 h claro:12 h escuro, sendo o período claro simulado com lâmpada fluorescente com irradiação de luz visível de 96 mW/cm² (Philips TLT 40 W/75). Os camarões foram diariamente alimentados com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish®). Para a obtenção de fêmeas ovígeras em laboratório, os camarões foram distribuídos nos aquários na proporção de 1 macho: 3 fêmeas. Os procedimentos de coleta foram aprovados pelo IBAMA (Autorização Permanente nº 15294-1/2008).

3.2. Delineamento dos grupos experimentais

Para avaliar a indução à mitofagia nas células embrionárias de *M. olfersii*, foram adotados dois grupos experimentais, conforme o descrito abaixo:

Grupo 1: Avaliação dos níveis de transcritos dos genes relacionados à mitofagia (*Tomm20*, *Opa1*, *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3*) durante o desenvolvimento embrionário de *M. olfersii* (Figura 5A). Para esta etapa, foram selecionados embriões nos dias E1, E3, E4, E7, E10 e E14.

Grupo 2: Avaliação do efeito da exposição à radiação UVB na indução da mitofagia nas células embrionárias de *M. olfersii* (Figura 5B), analisando as sequências codificantes (*Tomm20*, *Opa1*, *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3*) e o conteúdo proteico (TOM20, PINK1, p62 e LC3B). Para esta etapa, fêmeas ovígeras obtidas em laboratório com embriões em E7, foram expostas a 30 min de radiação UVB. Após a exposição, os embriões foram analisados em dois intervalos de tempo: 6 h e 12 h. Embriões em E7 de fêmeas não irradiadas foram usados como controles correspondentes.

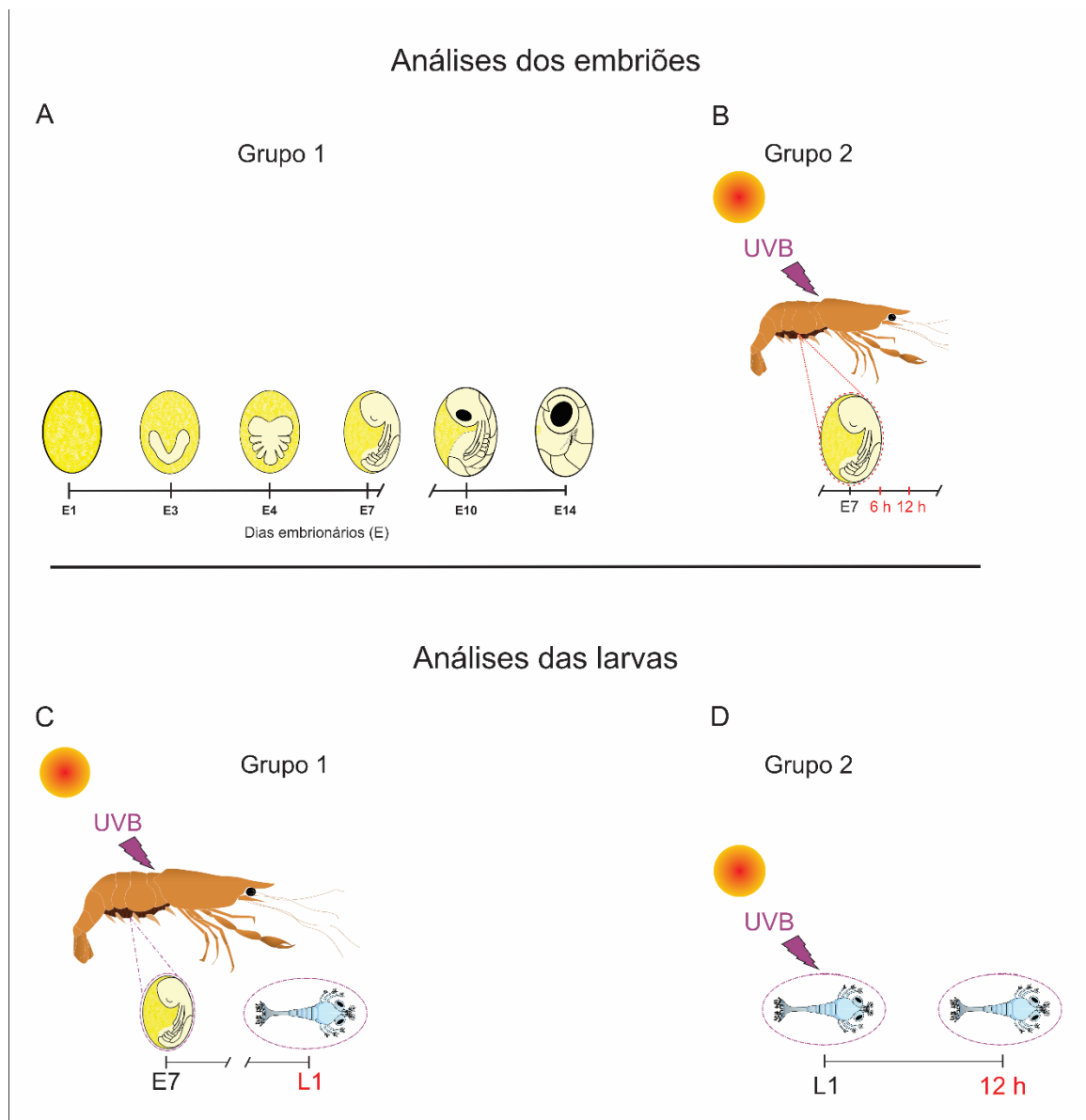


Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental para as análises de embriões e larvas de *Macrobrachium olfersii*.

E: dia embrionário; h: horas após exposição à UVB; L1: larva no primeiro dia; UVB: radiação ultravioleta B. Fonte: da autora, 2024.

Para avaliar os efeitos da radiação UVB nas células larvais de *M. olfersii*, foram adotados dois grupos experimentais, conforme descrito abaixo:

Grupo 1: Avaliação dos danos causados pela radiação UVB nas células embrionárias de *M. olfersii* e seu impacto no desenvolvimento das larvas (Figura 5C). Fêmeas com embriões em estágio E7 foram irradiadas, e as larvas em estágio L1 foram analisadas.

Grupo 2: Avaliação da similaridade entre as respostas celulares em embriões e larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB (Figura 5D). Larvas no primeiro dia larval (L1) foram irradiadas e analisadas 12 h após a exposição.

Para ambos os grupos experimentais, as larvas foram analisadas com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição à radiação UVB sobre o comportamento de fototropismo, índice do olho, morfologia externa e o conteúdo das proteínas envolvidas na apoptose (caspase3), proliferação celular (PHH3), e na ativação da mitofagia (TOM20, PINK1, p62 e LC3B).

Amostras de ovos e larvas ($n \approx 10$ ovos/larvas) foram utilizadas para o reconhecimento das características morfológicas externas dos embriões e larvas, com auxílio de estereomicroscópio Olympus SZX16. Neste trabalho foi adotado o estagiamento por dia embrionário (E), descrito por Simões-Costa *et al.* (2005), e estágios larvais proposto por Dugger e Dobkin *et al.* (1975).

3.3. Procedimentos de irradiação

Fêmeas ovígeras com embriões em E7 e larvas no primeiro estágio larval (L1), de *M. olfersii*, foram transferidas para aquário de 30 L desprovido de abrigos, equipado com lâmpada UVB de 6 W de potência (Vilber Lourmat) e irradiadas por 30 min (Figura 6). A exposição à radiação UVB simulou a irradiância natural de 310 mW/cm^2 (dose de 558 J.cm^2), a qual as fêmeas de *M. olfersii* estão expostas durante a estação reprodutiva na Ilha de Santa Catarina, de acordo com Nazari *et al.* (2010).



Figura 6. Aquário de irradiação equipado com lâmpada UVB, utilizado para ensaios laboratoriais de irradiação de fêmeas ovígeras e larvas de *Macrobrachium olfersii*.

Fonte: acervo do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, 2019.

3.4. Análise das sequências codificantes das proteínas associadas à mitofagia em embriões

3.4.1. Identificação *in silico* das sequências codificantes

Foram selecionados genes que codificam proteínas que atuam na indução de mitofagia, como *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3*, além de genes que codificam proteínas das membranas mitocondriais interna e externa, *Opa1* e *Tomm20*, respectivamente. Sequências de outras espécies, listadas no Quadro 1, foram obtidas do banco de dados *GenBank* e utilizadas para a busca de sequências no transcriptoma dos embriões de *M. olfersii* (Jaramillo *et al.*, 2016), a partir do algoritmo tBlastn (e-value $<e^{-5}$). As regiões codificantes das sequências identificadas em *M. olfersii* foram obtidas usando OrfFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). A similaridade das sequências de aminoácidos com as sequências não redundantes (nr) no banco de dados *GenBank* foi realizada através do algoritmo Blastp. As sequências dos transcritos analisados de *M. olfersii* foram depositadas no banco de dados *GenBank* e possuem número de acesso descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências nucleotídicas dos genes envolvidos na indução da mitofagia e na codificação das proteínas das membranas mitocondriais, selecionadas do *GenBank*, utilizadas para a busca de sequências similares no transcriptoma dos embriões de *Macrobrachium olfersii*, com os números de acesso das sequências de *M. olfersii* depositadas no *GenBank*.

Função	Gene	Espécie selecionada com o número de acesso do <i>GenBank</i> , utilizadas para busca no transcriptoma de <i>M. olfersii</i> .	Número da sequência de <i>M. olfersii</i> , depositada no <i>GenBank</i>
Indução à mitofagia	<i>Pink1</i>	<i>Eurytemora affinis</i> _ XM023489334	OR340978
	<i>Prkn</i>	<i>Penaeus vannamei</i> _ XM027357483	OR340979
	<i>Sqstm1</i>	<i>Penaeus vannamei</i> _ XM027374272	OQ127420
	<i>Map1lc3</i>	<i>Artemia parthenogenetica</i> _ KP317126	OQ127421
Membranas mitocondriais	<i>Opa1</i>	<i>Mus musculus</i> _ NM001199177	OR340980
	<i>Tomm20</i>	<i>Hyalella azteca</i> _ XM018157450	OQ127419

3.4.2. Análise da filogenia dos genes

As sequências de nucleotídeos de espécies de crustáceos foram obtidas usando o algoritmo Blast a partir da sequência de consulta no banco de dados *GenBank*. Essas sequências foram alinhadas utilizando a plataforma online CLUSTAL OMEGA (Sievers *et al.*, 2011). O alinhamento foi importado para o software MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018) e submetido à ferramenta de seleção de modelo. Os melhores modelos

de substituição encontrados para os genes *Tomm20*, *Opa1*, *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3* foram, respectivamente: K2 + G + I (Kimura 2-parameter + Gamma + Invariant sites), GRT + G + I (General time reversible + Gamma + Invariant sites), T92 + G + I (Tamura 3-parameter + Gamma + Invariant sites), T92 + G (Tamura 3-parameter + Gamma), GTR + G (General time reversible + Gamma), K2 + G + I (Kimura 2-parameter + Gamma + Invariant sites). Posteriormente, árvores filogenéticas foram geradas no MEGA-X, pelo método de Máxima Verossimilhança, com um *bootstrap* de 1.000 replicatas. A identificação de domínios conservados nas sequências de *M. olfersii* foi conduzida através do NCBI Conserved Domains, e representações gráficas foram elaboradas usando o IBS: *Illustrator for Biological Sequences* versão 1.0.3. (Liu *et al.*, 2015).

3.4.3. Desenho dos iniciadores para análises por RTq-PCR

A partir do transcriptoma dos embriões de *M. olfersii*, os iniciadores das sequências codificantes (*Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Tomm20* e *Opa1*) foram desenhados através do software Oligo Explorer v1.5 (Gene Link, NY, USA). A qualidade dos iniciadores foi analisada com o programa OligoAnalyzer 3.1 (Gene Link, NY, USA), e a verificação das principais variáveis que determinam a sua eficiência, foram as seguintes: (i) ausência de dímeros; (ii) ausência de estruturas *hairpin*; (iii) composição de guanina e citosina próxima a 50 % para proporcionar maior estabilidade. O gene *RpL8* (proteína ribossomal L8) foi utilizado como gene de referência (Jaramillo *et al.*, 2017). As sequências dos iniciadores estão listadas no Quadro 2. Não ocorreu amplificação nos controles da técnica, validando o procedimento.

A eficiência de amplificação para cada gene foi calculada a partir de uma série de diluição de pools de cDNA (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160) de todas as amostras usando a equação $E = 10^{-1/\text{slope}}$ (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2004), onde a inclinação foi estimada com a regressão linear do valor Ct e do logaritmo da quantidade de cDNA.

Quadro 2. Sequências de iniciadores dos genes de interesse e eficiência, para análises por RT-qPCR em embriões de *Macrobrachium olfersii*.

Gene	Iniciador - Forward	Iniciador - Reverse	Eficiência
<i>Tomm20</i>	GAAATTGAGGCAGGAGTGGA	CAGTATGCTCTCCCCAACAG	97 %
<i>Opa1</i>	GCTGCAGAAAAAGAGAGAGA	CTATAGTGTCACCAGCCTTG	97 %
<i>Pink1</i>	ATGATGACGATGCTGACAGA	CAACAAAAACACACGGCATC	100 %
<i>Prkn</i>	TGTCAGAACGAATACAGGTG	TGAATGGTGACCTAGATCGC	95 %
<i>Sqstm1</i>	TACCTCAAAGACCCCTGATG	TCGACATCACTTTCCATCTG	96 %
<i>Map1lc3</i>	GAAGTACCCGGATAGAGTTC	GACAAAGAAGAAGAGGGCAT	100 %

3.4.4. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído dos embriões (n = 70 mg de embriões/4 fêmeas/dia embrionário/grupo experimental). As amostras de 70 mg contêm aproximadamente 1.200 ovos, foram homogeneizadas em Brazol (LGC Biotecnologia®) e centrifugadas (12.000 X g por 10 min a 4 °C). Ao sobrenadante foi adicionado 200 µL de clorofórmio gelado (5:1 Brazol/Clorofórmio) e as amostras foram centrifugadas novamente (12.000 X g por 15 min a 4 °C). Foi coletado o sobrenadante e adicionado 500 µL de isopropanol e novamente centrifugado (12.000 X g por 15 min a 4 °C). O precipitado foi lavado com etanol a 75 %, centrifugado 12.000 X g por 10 min a 4 °C e diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 1 %. As amostras de RNA purificado foram tratadas com DNase I (1 U/mL, Thermo Scientific®) durante 30 min a 37 °C e 10 min a 65 °C. Em seguida, as amostras (90 µL) foram precipitadas utilizando 10 µL acetato de sódio a 3 M (pH 5,2) e 100 µL de isopropanol P.A. Depois da centrifugação (12.000 X g por 10 min a 4 °C), o precipitado foi lavado com etanol a 75 %, secado e solubilizado em água tratada com DEPC a 1 %. A integridade de RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corado com GelRed (1:500). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 0,5 X (Tris-hidroximetilaminometano, ácido acético glacial, ácido etilenodiaminotetracético) a 100 V durante 30 min. O gel foi fotodocumentado em ChemDoc MP (Bio-Rad) (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB/CCB/UFSC). A quantificação do RNA total foi realizada através do Nano espectrofotômetro BIO-5000-BI (KASUAKI) (Laboratório Neuroquímica I - CCB/UFSC) e as amostras com valores de 260/280 e 260/230 > 1,8 foram selecionadas para a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.4.5. Síntese do cDNA

A partir das amostras de RNA total, foi realizada a síntese de cDNA, utilizando Kit de Transcriptase Reversa GoScript™ (Promega). A reação de síntese consistiu em 1 µg do RNA total, 0,5 µg do primer oligo (dT), 4 µL de GoScript 5X Reaction Buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 1 µL de mix de nucleotídeos a 10 mM, inibidor de ribonuclease (20 unidades) e 1 µL da enzima GoScript Reverse Transcriptase. As reações de cDNA foram mantidas a 25 °C por 5 min, a 42 °C por 50 min e 15 min a 70 °C. As amostras de cDNA foram diluídas em água deionizada (1:10) e armazenadas a -20 °C.

3.4.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Os níveis de transcritos dos genes *Tomm20*, *Opa1*, *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3* nos embriões de *M. olearii* foram quantificados utilizando o QuantiFast SYBR®Green PCR Kit (Qiagen) através do equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (LAMEB/CCB/UFSC). Os iniciadores utilizados estão descritos no tópico 3.4.3. Cada reação de qPCR consistiu de 5 µL de QuantiFast SYBR®Green PCR Kit (Qiagen), 0,3 µL de cada iniciador, 1 µL de cDNA diluído (1/10) e água livre de nuclease em volume total de 10 µL. Para todas as amostras de cDNA foram realizadas reações em duplicata para cada gene. As condições de qPCR foram as seguintes: desnaturação a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 5 seg, anelamento e extensão a 62 °C por 1 min. Os níveis de transcritos dos genes foram normalizados com o gene *RpL8* e a expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Para as análises de RT-qPCR, um cut-off > 1,5 X foi considerado para determinar diferenças na expressão gênica.

3.5. Procedimentos para microscopia de luz dos embriões e larvas

3.5.1. Fixação e inclusão dos embriões e larvas

Os embriões em E7 foram fixados em solução PEM-FA (tampão PIPES a 0,1 M + EGTA a 2,0 mM + MgSO₄ a 1,0 mM + formaldeído a 3,7 %) pH 6,9, por 30 min à temperatura ambiente. Após a fixação, os embriões foram mantidos em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*, composto por NaCl a 500 mM + KCl a 3 mM + KH₂PO₄ a 1 mM + de NaH₂PO₄ a 12 mM) pH 7,4 a 4 °C. Em seguida, os embriões foram submetidos a banhos em solução crioprotetora de

sacarose a 5 % e 15 % por 3 h a 4 °C e em solução de sacarose a 30 % por 24 h a 4 °C. A inclusão dos ovos foi realizada com meio comercial Tissue Tek® a -25 °C. Após a montagem, as lâminas foram mantidas a 4 °C para preservação dos cortes. Os cortes histológicos foram obtidos em micrótomo criostato Leica CM 1850 UV (LAMEB/CCB/UFSC).

As larvas em estágio L1 foram fixadas por 3 h em Bouin alcoólico e, em seguida, armazenadas em álcool a 70 %. A desidratação foi realizada com banhos de etanol em concentrações crescentes (70 % a 100 %), com trocas a cada 10 min. A diafanização foi realizada em xilol, usando dois banhos: xilol I (50 % de álcool a 100 % + 50 % de xilol a 100 %) e xilol II (xilol a 100 %). Foram realizados 3 banhos para a inclusão das larvas em parafina de 30 min cada. Os cortes histológicos foram obtidos em um micrótomo Olympus Cut 4055 (LRDA/CCB/UFSC).

As secções histológicas de embriões e larvas foram obtidas com espessura de 6 µm. As secções dos diferentes grupos (embrião/larva), foram montados juntos nas lâminas, garantindo as mesmas condições durante a realização da técnica de imuno-histoquímica. Para controle histológico e verificação da integridade dos tecidos e células, foi realizada coloração com Hematoxilina-Eosina.

3.5.2. Marcações celulares por imuno-histoquímica nos embriões e larvas

Para imunolocalizar as proteínas alvo TOM20 (localizada na membrana externa da mitocondria), PINK1 (que se liga a TOM20, iniciando a cascata de sinalização para a mitofagia), p62 (que atua como um adaptador ligando as mitocondrias ao autofagossomo) e LC3B (localizada na membrana do autofagossomo). Após a retirada do meio de montagem, as secções foram tratadas com peróxido de hidrogênio: metanol a 100 % (1:2) por 10 min para a inativação das peroxidases endógenas. A permeabilização das membranas celulares foi realizada com banho PBS a 0,1 M (pH 7,4) + Triton X-100 a 0,3 % por 30 min e em seguida, as secções foram imersas em soro fetal bovino (SFB) a 5 % por 45 min para a inativação dos sítios inespecíficos. As secções foram incubadas com os anticorpos primários em diluição 1:100, por 12 h em câmara úmida a 4 °C. Após, as secções foram lavadas com PBS + Triton X-100 a 0,3 % e em seguida incubadas com os anticorpos secundários em diluição 1:100, durante 3 h à temperatura ambiente. As secções foram lavadas com PBS Triton X-100 a 0,1 %. Logo após, foram tratados com avidina-peroxidase por 45 min. A revelação

colorimétrica foi realizada com solução de PBS + 3,3'diaminobenzidina (DAB) + H₂O₂, sendo interrompida com água destilada. Posteriormente, as secções foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70 % - 100 %) e diafanizadas com xilol. As lâminas foram montadas em meio Entellan®. Os controles negativos da reação por imuno-histoquímica foram realizados da mesma forma, suprimindo-se a incubação com o anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS a 0,1 M.

As lâminas histológicas com embriões foram lavadas em água corrente três vezes à temperatura ambiente para remover o meio de montagem. Os anticorpos primários utilizados foram: Invitrogen, mouse anti-TOM20 IgG; Santa Cruz Biotechnology, rabbit anti-PINK1 IgG; Cell Signalling, rabbit anti-SQSTM1/p62 IgG; Invitrogen, rabbit anti-LC3B IgG. Os anticorpos secundários foram: Sigma-Aldrich, anti-rabbit IgG; Sigma-Aldrich, anti-mouse IgG.

As lâminas com larvas passaram por desparafinização em xilol e hidratação em banhos de etanol em concentrações decrescentes (100 % a 70 %). Os anticorpos primários utilizados foram: Invitrogen, mouse anti-TOM20 IgG; Invitrogen, rabbit anti-PINK1 IgG; Invitrogen, rabbit anti-SQSTM1/p62 IgG; Invitrogen, mouse anti-LC3B IgG. Os anticorpos secundários: Sigma-Aldrich, anti-rabbit IgG; Sigma-Aldrich, anti-mouse IgG.

A quantificação das células marcadas por imuno-histoquímica colorimétrica foi realizada em microscópio de luz marca Olympus CBA (aumento de 100 X), com auxílio da grátula de Weibel nº 2 – M42 (Freere e Weibel, 1967). A contagem das células positivas para os anticorpos foi realizada pelo método de 42 pontos. Utilizou-se 1 campo visual por embrião (30 embriões/grupo experimental/triplicata) e 2 campos visuais por larva (9 larvas/grupo/triplicata).

3.6. Quantificação de células marcadas por citometria de fluxo nos embriões

Para imunolocalizar as proteínas alvo p62 (que atua como um adaptador ligando as mitocôndrias ao autofagossomo) e LC3B (localizada na membrana do autofagossomo), os embriões (n = 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata) foram fixados em solução de paraformaldeído a 1 % por 18 h a 4 °C. Após a fixação, os mesmos foram submetidos a três banhos consecutivos de PBS 1 M, pH 7,4. Em seguida, foram homogeneizados por trituração com PBS e Tween-20®, e as células dissociadas com tripsina por 15 min a temperatura ambiente. 100 µL de BSA

(albumina sérica bovina) a 10 % foram adicionados às amostras, as quais permaneceram em agitação por 45 min e posteriormente, centrifugadas a 640 X g por 20 min. Após a centrifugação, somente o sobrenadante foi utilizado. Amostras de células foram separadas em alíquotas de 1 mL contendo aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários: Cell Signalling, rabbit anti-SQSTM1/p62 IgG; Invitrogen, rabbit anti-LC3B IgG, em diluição 1:1000 por 1 h, seguido da incubação com anticorpo secundário: Life Technologies, Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG, em diluição 1:1000, por 45 min à 4 °C ao abrigo de luz. A análise das marcações celulares foi realizada no Citômetro de Fluxo FACSCanto II (LAMEB/CCB/UFSC) e as análises dos dados no programa Flowing Software 2.

3.7. Análises morfológicas das larvas

As imagens das larvas foram capturadas com câmera digital Olympus DP73® de 17 megapixels e adquiridas com o software CellSens Dimension 1.12®. A análise da transparência das células larvais foi realizada nas regiões da carapaça, abdômen e telson, para a determinação da intensidade média de transparência nessas regiões (n = 9 larvas/grupo experimental/ triplicata). Essa análise e as subsequentes foram realizadas com FIJI/ImageJ® (NIH), utilizando unidades arbitrárias de intensidade de pixel [a.u.].

3.7.1. Morfometria das larvas

Para a realização das morfometrias, o comprimento corporal das larvas foi medido considerando separadamente o tamanho do cefalotórax e do abdômen. O comprimento do cefalotórax foi obtido pela distância entre o início do lobo óptico e o final da inserção dos pereópodes; já o comprimento do abdômen foi medido a partir da distância entre o primeiro segmento abdominal e o final do abdômen (Figura 7), (n = 9 larvas/grupo experimental/ triplicata).

3.7.2. Índice do olho das larvas

Para determinar o índice do olho (IO), conforme estabelecido por Perkins (1972), foram medidas as áreas pigmentadas do olho das larvas de cada grupo experimental. As medições incluíram o maior eixo (MaE) e o menor eixo (MeE) do olho. O índice foi

calculado utilizando a fórmula: $IO (\mu m) = (MaE + MeE) / 2$ (Figura 7), ($n = 9$ larvas/grupo experimental/triplicata).

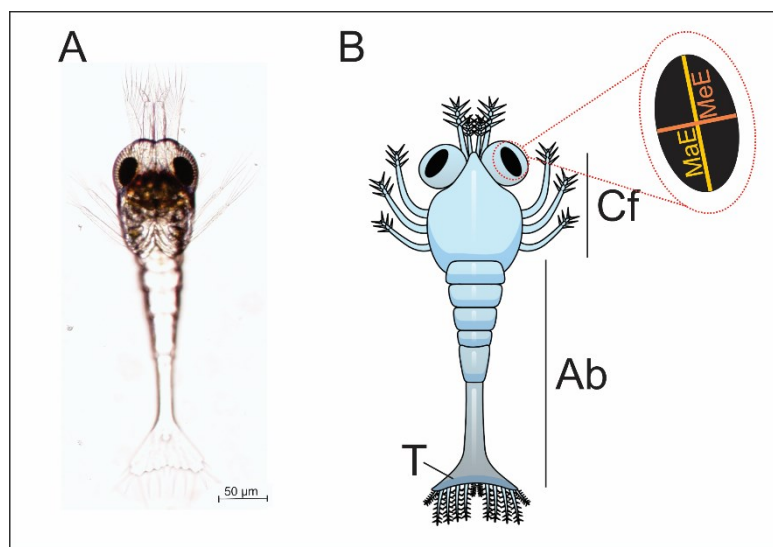


Figura 7. Vista dorsal das larvas de *Macrobrachium olfersii*. Larva em estágio L1 após a eclosão (A). Esquema representativo das morfometrias realizadas no cefalotórax, abdômen e índice do olho (B).

Ab: abdômen; Cf: cefalotórax; MaE: maior eixo; MeE: menor eixo. Fonte: da autora, 2024.

3.8. Análise do comportamento larval

As larvas foram avaliadas quanto ao comportamento de fototropismo positivo, conforme o estabelecido por Galiano (2011) ($n = 30$ larvas/grupo experimental/triplicata). O teste consistiu em analisar a distribuição espacial das larvas em um aquário retangular com capacidade de 500 mL (Figura 8). O aquário foi dividido em duas partes iguais por uma divisória móvel. Em uma das partições do aquário, as larvas foram colocadas e aclimatadas durante 10 min. Após o tempo de aclimação, a divisória móvel do aquário foi removida e uma fonte de luz foi fixada, iluminando apenas metade do aquário durante 10 min. Após esse tempo, a divisória móvel foi recolocada e o número de larvas que migraram para o lado iluminado foi contado.

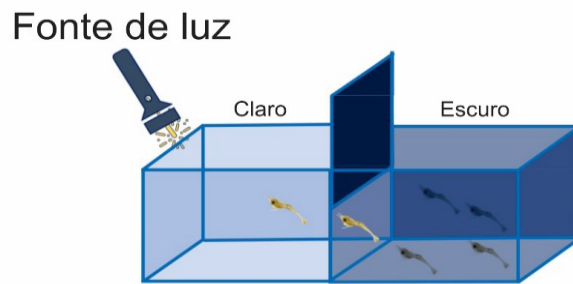


Figura 8. Representação esquemática do aquário utilizado para as análises do comportamento larval de *Macrobrachium olfersii*.

Fonte: acervo do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, 2024.

3.9. Análises estatísticas

Para a análise dos embriões, após verificar a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, as diferenças significativas entre as médias dos níveis de transcritos nos diferentes dias embrionários e entre os grupos experimentais irradiado e não-irradiado, utilizou-se ANOVA de uma via (One-Way ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Já para avaliar as diferenças nas médias do conteúdo protéico entre os grupos experimentais irradiados e não irradiados de embriões, foi empregado o teste t de Student. Para a análise das larvas, diferenças significativas entre os dois grupos experimentais foram avaliadas utilizando ANOVA de uma via (One-Way ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Um nível de significância de $P < 0,05$ foi adotado para as análises dos embriões e larvas. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e analisados utilizando o software Statistica® para Windows.

4. CAPÍTULO 1

4.1. Contextualização

Este capítulo contempla artigo publicado na revista *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* (2024), ISSN 1531-4332, Impact Factor 2.1/2023, Qualis/CAPES A1.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111664>

A hipótese central do artigo é que a radiação UVB induz a mitofagia em células embrionárias de *M. olfersii*, ativando a transcrição de genes como *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Opa1* e *Tomm20*. A expressão desses genes identifica as mitocôndrias danificadas, desencadeando a mitofagia mediada pelas proteínas TOM20, PINK1, p62 e LC3B.

4.1.1. Objetivos específicos da tese contemplados no artigo

- Identificar e caracterizar *in silico* as sequências codificantes dos genes *Tomm20* e *Opa1*, relacionados a transcrição e tradução de proteínas das membranas mitocondriais externa e interna, respectivamente, a partir da análise do transcriptoma dos embriões de *M. olfersii*;

- Identificar e caracterizar *in silico* as sequências codificantes dos genes *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Pink1*, *Prkn*, associados ao processo de mitofagia, a partir da análise do transcriptoma dos embriões de *M. olfersii*;

- Determinar a relação filogenética entre espécies de crustáceos, das sequências codificantes dos genes *Tomm20*, *Opa1*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Pink1* e *Prkn*, associados ao processo de mitofagia dos embriões de *M. olfersii*;

- Avaliar em diferentes estágios do desenvolvimento de *M. olfersii* e em embriões expostos à radiação UVB, os níveis de transcritos dos genes *Tomm20*, *Opa1*, *Sqstm1*, *Map1lc3*, *Pink1*, *Prkn*, associados a mitofagia;

- Imunolocalizar e quantificar as células positivas para as proteínas TOM20, PINK1, p62 e LC3B, em células embrionárias e larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB;

4.1.2. Hipóteses da tese contempladas no artigo

-Os genes de *M. olfersii* que codificam proteínas envolvidas na mitofagia são evolutivamente conservados;

-A mitofagia é um evento inerente ao desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*;

-A exposição à radiação UVB induz a superexpressão de genes e proteínas envolvidas no processo mitofágico nas células embrionárias de *M. olfersii*.

4.1.3. Materiais e métodos da tese contemplados no artigo

3.1. Coleta dos animais e obtenção dos embriões e larvas

3.2. Delineamento dos grupos experimentais

3.3. Procedimentos de irradiação

3.4. Análise das sequências codificantes das proteínas associadas à mitofagia em embriões

3.4.1. Identificação *in silico* das sequências codificantes

3.4.2. Análise da filogenia dos genes

3.4.3. Desenho dos iniciadores para análises por RTq-PCR

3.4.4. Extração do RNA total

3.4.5. Síntese do cDNA

3.4.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

3.5. Procedimentos para microscopia de luz dos embriões e larvas

3.5.1. Fixação e inclusão dos embriões e larvas

3.5.2. Marcações celulares por imuno-histoquímica nos embriões e larvas

3.6. Quantificação de células marcadas por citometria de fluxo nos embriões

3.9. Análises estatísticas

4.2. Artigo: UVB radiation exposure modulates mitophagy in embryonic cells of freshwater prawn *Macrobrachium olfersii*: Exploring a protective organelle quality control mechanism

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 295 (2024) 111664



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpa



UVB radiation exposure modulates mitophagy in embryonic cells of freshwater prawn *Macrobrachium olfersii*: Exploring a protective organelle quality control mechanism

Giuliam K. Strücker¹, Michael L. Jaramillo¹, Thaline de Quadros, Evelise M. Nazari^{*}

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

ARTICLE INFO

Edited by: Michael Hedrick

Keywords:
Ultraviolet radiation
Aquatic embryo
Development
Mitochondria
Autophagy

ABSTRACT

Aquatic environments are subject to ultraviolet B (UVB) radiation incidence, and its effects on organisms are dose-dependent. Besides DNA, mitochondria are an important target of this radiation that causes structural damage and impairs its functional dynamics. Here, we hypothesize that mitophagy acts as an organelle quality control mechanism to mitigate UVB impacts in embryonic cells. Then, freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* embryos was used as a model to investigate the effects of UVB on genes (*Tomm20*, *Opa1*, *Pink*, *Prkn*, *Sqstm1*, and *Map1lc3*) and proteins (TOM20, PINK1, p62 and LC3B) involved in mitophagy modulation. The choice of genes and proteins was based on the identification of mitochondrial membrane (*Tomm20*, *Opa1* and TOM20), mediation of mitophagy (*Pink1*, *Prkn* and PINK1), and recognition of mitochondria by the autophagosome membrane (*Sqstm1*, *Map1lc3*, p62 and LC3B). First, the phylogeny of all genes presented bootstrap values >80 and conserved domains among crustacean species. Gene expression was inherently modulated during development, with transcripts (*Tomm20*, *Opa1*, *Pink*, *Prkn*, *Sqstm1*, and *Map1lc3*) overexpressed in the initial and final stages of development. Moreover, UVB radiation induced upregulation of *Tomm20*, *Opa1*, *Pink*, *Prkn*, *Sqstm1*, and *Map1lc3* genes at 6 h after exposure. Interestingly, after 12 h, the protein content of PINK1, p62, and LC3B increased, while TOM20 was not responsive. Despite UVB radiation's harmful effects on embryonic cells, the chronology of gene expression and protein content indicates rapid activation of mitophagy, serving as an organelle quality control mechanism, given the analyzed cells' integrity.

1. Introduction

Ultraviolet B (UVB; 320–290 nm) radiation is the short wavelength component of the solar ultraviolet spectrum that can reach the Earth's surface and significantly penetrates aquatic ecosystems (Diffey, 1991; Häder et al., 2011; Williamson et al., 2019). UVB radiation causes specifically DNA damage by pyrimidine-dimer formation, and adults of aquatic species generally present mechanisms to avoid and mitigate the UVB radiation effects, such as physical barriers-like calcified shells, vertical migration on the water column, and color change, by the activation of the chromatophores (Ruelas et al., 2006; Pasparakis et al., 2019). Moreover, many aquatic organisms possess additional antioxidant defenses, such as the enzymatic system of catalase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase, which are activated by UVB

exposure (Hollmann et al., 2015; Das et al., 2021). Additionally, many species are competent in repairing DNA by photoreactivation involving the enzyme photolyase (Häder and Sinha, 2005). However, mechanisms to mitigate the impacts of UVB radiation on embryos and larvae of aquatic species may not have fully developed at these life stages or may be poorly understood (Epel et al., 1999; Nazari et al., 2010; Nazari et al., 2013). In this scenario, autophagy seems as a potential cellular event that may act as a complementary mechanism during development to attenuate the harmful effects of UVB radiation.

The autophagy process is an intracellular degradation system that delivers cytoplasmic constituents to the lysosome (Ohsumi, 2014), and altered mitochondria can be marked for degradation through mitophagy (a process of selective autophagy) (Onishi et al., 2021). Although mitophagy can be inducible in adverse conditions, it is also an inherent

^{*} Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, Sala 310 B, Córrego Grande, Florianópolis CEP 88040-900, Brazil.

E-mail address: evelise.nazari@ufsc.br (E.M. Nazari).

¹ Giuliam K. Strücker and Michael L. Jaramillo contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.111664>

Received 20 February 2024; Received in revised form 8 May 2024; Accepted 9 May 2024

Available online 10 May 2024

1095-6433/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

5. CAPÍTULO 2

5.1. Contextualização

Este capítulo contempla artigo a ser submetido na revista Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, ISSN 1873-2682, Impact Factor 3.9/2023, Qualis/CAPES A1.

A hipótese central do artigo é que a exposição à radiação UVB induz alterações morfológicas, compromete o comportamento do fototropismo positivo, induz a formação de dímeros de timina no DNA, desencadeia apoptose, diminui a proliferação celular e ativa a mitofagia nas células larvais de *M. olfersii*.

5.1.1. Objetivos específicos da tese contemplados no artigo

- Imunolocalizar e quantificar as células positivas para dímeros de timina, caspase3 e PHH3 em células larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB;

- Imunolocalizar e quantificar as células positivas para as proteínas TOM20, PINK1, p62 e LC3B, em células embrionárias e larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB;

- Analisar a morfologia externa das larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB, avaliando o comprimento corporal, índice do olho e transparência celular;

- Avaliar o desempenho larval através da análise do comportamento de fototropismo positivo de *M. olfersii* expostos à radiação UVB.

5.1.2. Hipóteses da tese contempladas no artigo

- As células larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB apresentam dano ao DNA, através da formação de dímeros de timina;

- A exposição à radiação UVB induz a superexpressão de proteínas envolvidas no processo mitofágico nas células larvais de *M. olfersii*,

- As larvas de *M. olfersii* expostas à UVB apresentam diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose;

- As larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB apresentam alterações morfológicas;

- A exposição à radiação UVB compromete o desempenho larval de *M. olfersii*.

5.1.3. Materiais e métodos da tese contempladas no artigo

- 3.1. Coleta dos animais e obtenção dos embriões e larvas
- 3.2. Delineamento dos grupos experimentais
- 3.3. Procedimentos de irradiação
- 3.5. Procedimentos para microscopia de luz dos embriões e larvas
 - 3.5.1. Fixação e inclusão dos embriões e larvas
 - 3.5.2. Marcações celulares por imuno-histoquímica nos embriões e larvas
- 3.7. Análises morfológicas das larvas
 - 3.7.1. Morfometria das larvas
 - 3.7.2. Índice do olho das larvas
- 3.8. Análise do comportamento larval
- 3.9. Análises estatísticas

5.2. Artigo: A exposição à radiação UVB induz alterações na morfologia externa, nos eventos celulares e no comportamento das larvas do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*.

Giuliam Kátia Strücker^a, Evelise Maria Nazari^{a,b}

^a. Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

^b. Autor correspondente: e-mail: evelise.nazari@ufsc.br; telefone: +55 (55) 3721 9799; Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina - Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - Sala 310 B - Córrego Grande, Florianópolis/Brasil - CEP 88040-900.

Resumo

A incidência de radiação UVB na superfície da Terra tem aumentado, afetando os organismos aquáticos. Essa radiação pode alterar a morfologia corporal, o comportamento de fototropismo, induzir a formação de dímeros de timina no DNA e alterar a dinâmica mitocondrial em várias espécies aquáticas. *Macrobrachium olfersii*, um camarão de água doce essencial para o ciclo de energia dos ambientes aquáticos, habita águas rasas e claras, o que o expõe à radiação UVB. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da radiação UVB na morfologia, no índice do olho, na transparência celular e no comportamento de fototropismo das larvas de *M. olfersii*. Além disso, buscamos avaliar a formação de dímeros de timina (indicativo de danos ao DNA), níveis das proteínas caspase3 (relacionada à apoptose), PHH3 (associada à proliferação celular), TOM20 (marcador da membrana externa mitocondrial), PINK1 (marcador de mitocôndrias danificadas), p62 (proteína adaptadora de LC3B) e LC3B (proteína da membrana de autofagossomos). Avaliamos se os danos induzidos pela radiação UVB nas células embrionárias persistem no desenvolvimento larval (primeiro conjunto) e analisamos se as células larvais respondem à radiação UVB de forma semelhante às células embrionárias (segundo conjunto). No primeiro conjunto de experimentos, o comprimento corporal das larvas e o índice do olho aumentaram, enquanto no segundo conjunto, ambos os parâmetros diminuíram. Além disso, a migração das larvas para campos iluminados e a transparência celular diminuíram em ambos os conjuntos de experimentos. As células das larvas irradiadas com UVB apresentaram aumento na formação de dímeros de timina, diminuição nos níveis da proteína PHH3 e aumento nos níveis da proteína caspase3. Os níveis das proteínas PINK1, p62 e LC3B aumentaram em ambos os conjuntos de experimentos, enquanto TOM20 aumentou apenas no segundo conjunto. Essas alterações celulares e morfológicas podem afetar o desenvolvimento larval, comprometendo sua capacidade de evadir predadores e, potencialmente, reduzindo a população.

Palavras-chave: Apoptose; Dano ao DNA; Fototropismo; Índice do olho; Mitochondria; Mitofagia; Proliferação celular.

1. Introdução

As mudanças na camada de ozônio causadas por poluentes liberados na atmosfera aumentaram a incidência de níveis de radiação ultravioleta B (UVB; 320 – 290 nm) na superfície da Terra [1, 2, 3]. Consequentemente, os níveis elevados de radiação UVB que atingem a superfície afetam não apenas animais terrestres, mas também impactam significativamente organismos aquáticos e as espécies que vivem e se reproduzem nesses ambientes [4, 5].

A radiação UVB tem relevância biológica para os seres vivos, desempenhando um papel na síntese de vitamina D, tanto em vertebrados quanto em invertebrados [6, 7, 8], bem como na orientação visual de muitas espécies [9, 10]. Por outro lado, dependendo da dose à qual os organismos estão expostos, essa radiação pode induzir danos às células e tecidos [11, 12, 13]. A energia do comprimento de onda da radiação UVB tem a capacidade de induzir danos ao DNA através da formação de dímeros de timina [14, 15, 16], além de afetar organelas celulares como as mitocôndrias [17, 18, 19].

As mitocôndrias são essenciais para a manutenção do metabolismo celular e tecidual [20]. Sua função e qualidade são reguladas pela dinâmica mitocondrial: biogênese (fusão e fissão) e mitofagia [21]. Quando danificadas, as mitocôndrias podem ser recicladas através da mitofagia, um mecanismo de controle de qualidade das organelas, regulado por vários processos complexos [22]. A mitofagia é um mecanismo essencial nas células e pode ser ativada em resposta à exposição à radiação UVB, como discutido por Zhang *et al.* [23], a fim de manter a homeostase mitocondrial.

Macrobrachium olfersii é um camarão de água doce que habita e se reproduz em águas rasas e claras, desempenhando um papel importante na ciclagem de energia dos ambientes aquáticos [24, 25]. Após o desenvolvimento embrionário, o embrião eclode em uma larva livre e natante (zoea) [26], que passa por vários estágios larvais até atingir a fase adulta [27]. As células embrionárias e larvais dessa espécie são transparentes, e seu desenvolvimento ocorre em águas rasas e claras. Como resultado, elas são expostas aos comprimentos de onda da radiação UVB que penetram essas profundidades. Pesquisas anteriores realizadas com embriões de *M. olfersii* mostraram que a radiação UVB tem a capacidade de induzir dímeros de timina na molécula de DNA, desencadear apoptose, diminuir a proliferação celular e induzir

alterações na dinâmica mitocondrial, como promover a fissão enquanto reduz a fusão [17, 28, 29].

Como embriões, as larvas de espécies aquáticas também são vulneráveis à radiação UVB devido a seus mecanismos protetores pouco desenvolvidos, como a pigmentação insuficiente e os níveis mais baixos de compostos que absorvem a energia da radiação UV, como os aminoácidos semelhantes a micosporina [30, 31]. A exposição à radiação UVB pode afetar a função celular e potencialmente comprometer o desempenho larval, como demonstrado por Lesser e Barry [32] em equinodermos. Além disso, larvas de várias espécies de crustáceos, como *M. olfersii*, demonstram fototropismo positivo, exibindo uma tendência a migrar para áreas de maior intensidade luminosa [33], expondo-se dessa forma à radiação UVB. Sua estrutura corporal transparente e respostas de natação com a cauda podem facilitar a evasão de predadores, aumentando sua sobrevivência [33, 34]. No entanto, a exposição à radiação UVB danifica a matriz extracelular nas células dos embriões, causando opacidade celular [35]. Essa redução na transparência celular na coluna d'água os torna mais visíveis para predadores, comprometendo consequentemente a viabilidade da população.

Nesse contexto, a hipótese proposta neste trabalho é que a exposição à radiação UVB induz alterações morfológicas, compromete o comportamento de fototropismo, induz a formação de dímeros de timina, desencadeia apoptose, diminui a proliferação celular e ativa a mitofagia nas células larvais de *M. olfersii*. Além disso, este estudo demonstra as diversas respostas das células de larvas aquáticas à exposição à radiação UVB.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta dos Animais e Obtenção dos Embriões e Larvas

Adultos de *M. olfersii* foram coletados na Lagoa do Peri, localizada na Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil (25° 35' S, 48° 35' W). Posteriormente, eles foram transportados para o laboratório e alojados em aquários de 60 L com aeração constante, mantidos a uma temperatura de 24 °C (± 1), sob um regime de fotoperíodo de 12 h de claro: 12 h de escuro, utilizando lâmpadas Philips TLT 40 W/75. Para obter fêmeas ovígeras, os camarões foram dispostos na proporção de 1 macho para 3 fêmeas nos aquários. Amostras de ovos (estágio E7, aproximadamente 10 ovos por

fêmea) e larvas do primeiro dia larval (estágio L1, aproximadamente 10 zoeas por fêmea) foram coletadas para analisar as características morfológicas externas usando um estereomicroscópio Olympus SZX16. Essa análise foi realizada com base na classificação embrionária proposta por Simões-Costa *et al.* [26] e na classificação larval proposta por Dugger e Dobkin [27]. Os procedimentos de coleta dos camarões, adotados neste estudo, foram aprovados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (número 15294-1/IBAMA/2008).

2.2. Desenho Experimental

Dois conjuntos experimentais foram realizados para avaliar se as células larvais de *M. olfersii* expostas à radiação UVB podem ativar a mitofagia como um mecanismo de controle de qualidade das organelas. Além disso, foram avaliadas a morfologia corporal, o índice do olho e o comportamento de fototropismo. No primeiro conjunto de experimentos, fêmeas com embriões no dia embrionário E7 (morfogênese inicial) foram irradiadas, e suas larvas foram analisadas logo após a eclosão, no estágio L1 (E7 – L1, primeiro conjunto). O objetivo principal dessa análise foi determinar se os danos mitocondriais induzidos durante o desenvolvimento embrionário permanecem ao longo do desenvolvimento até a eclosão das larvas, comprometendo assim seu desempenho. Estudos anteriores demonstraram que a radiação UVB pode induzir danos mitocondriais, comprometendo a dinâmica mitocondrial e desencadeando a mitofagia [17, 36]. Além disso, as células embrionárias de *M. olfersii* expostas à radiação UVB apresentaram aumento de transcritos após 6 horas de exposição, e respostas proteicas relacionadas a proteínas de apoptose e dinâmica mitocondrial após 12 horas [17, 29, 36].

No segundo conjunto de experimentos, larvas no estágio L1 foram irradiadas e analisadas 12 horas após a exposição (L1 – L1, segundo conjunto). Este conjunto teve como objetivo avaliar se as células larvais expostas à radiação UVB apresentam respostas semelhantes ou até superiores às células embrionárias.

Em ambos os conjuntos de experimentos, as larvas foram analisadas para determinar se a exposição à radiação UVB afeta a morfologia externa, alterando o comprimento corporal, a transparência corporal e o índice do olho, potencialmente comprometendo o comportamento de fototropismo. Além disso, analisamos a ativação da mitofagia por meio dos níveis das proteínas TOM20, PINK1, p62 e LC3B. O

procedimento de irradiação foi realizado com uma lâmpada UVB de 6W (Vilber Lourmat) por 30 minutos (dose de 558 J.cm⁻²). A irradiância UVB recebida foi de 310 mW.cm⁻², semelhante à irradiância solar UVB estimada que atinge a Ilha de Santa Catarina durante a temporada reprodutiva de *M. offersii*, de acordo com Nazari *et al.* [25]. As medições de UVB no laboratório foram realizadas utilizando um radiômetro/fotômetro (modelo IL 1400A, International Light). Ambos os conjuntos experimentais incluíram larvas não irradiadas como controles.

2.3. Análises Morfométricas das Larvas

As larvas de ambos os conjuntos foram analisadas usando um microscópio IX83[®] Olympus[®]. As imagens foram capturadas com uma câmera digital Olympus DP73[®] de 17 megapixels e adquiridas utilizando o software CellSens Dimension 1.12[®]. A análise subsequente das imagens foi realizada com o FIJI/ImageJ[®] (NIH). O comprimento do cefalotórax e do abdômen foi medido. N = 09 larvas/conjunto/triplicata.

2.4. Análise da Transparência Celular das Larvas

A análise de transparência das células larvais foi realizada utilizando o FIJI/ImageJ[®] (NIH), com unidades arbitrárias de intensidade de pixel [u.a.]. Três regiões distintas no corpo da larva (carapaça, abdômen e télson) foram selecionadas para esta análise, permitindo determinar a intensidade média de transparência nessas regiões. N = 09 larvas/conjunto/triplicata.

2.5. Análise do Comportamento de Fototropismo das Larvas

As larvas foram avaliadas quanto ao comportamento de fototropismo positivo, de acordo com o método estabelecido por Galiano [37]. O teste consistiu em analisar a distribuição espacial das larvas em um aquário retangular com capacidade de 500 mL. O aquário foi dividido em duas partes iguais por uma divisória móvel. Em uma das partes do aquário, as larvas foram alocadas e aclimatadas por 10 minutos. Após o tempo de aclimação, a divisória móvel foi removida e uma fonte de luz foi acoplada, iluminando apenas metade do aquário durante 10 minutos. Após esse tempo, a divisória móvel foi recolocada e o número de larvas que migraram para o lado iluminado foi contado. N = 30 larvas/conjunto/triplicata.

2.6. Análise do Índice do Olho

Para as análises do índice do olho, imagens das larvas de ambos os conjuntos foram capturadas usando uma câmera digital Olympus DP73® de 17 megapixels e adquiridas com o software CellSens Dimension 1.12®. A análise subsequente foi realizada utilizando o FIJI/ImageJ® (NIH). Medidas dos eixos maior e menor dos olhos das larvas foram obtidas em cada grupo experimental. O índice ocular (IO) foi então calculado utilizando a fórmula: $IO (\mu m) = (\text{eixo maior} + \text{eixo menor}) / 2$, conforme estabelecido por Perkins [38]. N = 09 larvas/conjunto/triplicata.

2.7. Imunohistoquímica

As larvas de cada conjunto foram fixadas em Bouin alcoólico por 3 horas, embebidas em parafina e seccionadas em série a 6 μm . As seções foram desparafinizadas e lavadas com peróxido de hidrogênio a 3 % em metanol, e em seguida lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) a 0,1 M com 0,3 % de Triton X-100 e 5 % de soro bovino fetal (FBS). Depois, foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpos primários: IgG1 de camundongo anti-dímeros de timina (1:50, Sigma; para identificar dímeros de timina na molécula de DNA), IgG de coelho anti-Caspase3 (1:100, Santa Cruz; para identificar células em apoptose), IgG de coelho anti-fosfo-histona H3 (1:100, Santa Cruz; para identificar células em proliferação celular), IgG de camundongo anti-TOM20 (1:100, Invitrogen; para identificar a membrana mitocondrial externa), IgG de coelho anti-PINK1 (1:100, Invitrogen; para identificar o sinal inicial da cascata de mitofagia), IgG de coelho anti-SQSTM1/p62 (1:100, Cell Signaling; para identificar proteína adaptadora entre a mitocôndria e a membrana do autofagossomo), IgG de camundongo anti-LC3B (1:100, Invitrogen; para identificar a membrana do autofagossomo). As seções foram lavadas com PBS a 0,1 M + 0,1 % Triton X-100 e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase à temperatura ambiente (Sigma-Aldrich, anti-IgG de coelho [A9044]; Sigma-Aldrich, anti-IgG de camundongo [A9169]) diluídos 1:100. Os locais de ligação dos anticorpos foram revelados com 3-3'-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma). Os controles negativos para a reação imunohistoquímica foram tratados de maneira semelhante, exceto que os anticorpos primários foram substituídos por tampão PBS 0,1 M (pH 7,4). A quantificação das células marcadas foi realizada

usando o método estereológico com Weibel Graticule nº 2 – M42, área de 36,36 mm² [39], no microscópio Olympus CBS. N = 09 larvas/conjunto/triplicata.

2.8. Análise Estatística

Diferenças significativas entre as médias dos dois conjuntos foram avaliadas usando ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey. Um nível de significância de $P < 0,05$ foi adotado. Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) e analisados utilizando o software Statistic® versão 13.0 para Windows.

3. Resultados

3.1. Efeitos da Radiação UVB na Morfologia Externa

As larvas provenientes de embriões expostos à radiação UVB (E7 – L1) apresentaram aumento no tamanho do corpo, tanto para o cefalotórax ($111,5 \pm 4,1$ e $249,8 \pm 9,5$) quanto para o abdômen ($223,1 \pm 17,1$ e $488,7 \pm 20,3$, $p < 0,0001$), em comparação com as larvas não irradiadas (Figura 1). As larvas irradiadas com UVB (L1 – L1) mostraram diminuição no cefalotórax ($114,5 \pm 3,9$ e $38,6 \pm 1,9$) e no abdômen ($212,2 \pm 26,0$ e $81,8 \pm 7,5$, $p < 0,0001$) em comparação com as não irradiadas (Figura 1).

As larvas provenientes de embriões expostos à radiação UVB (E7 – L1) não apresentaram alterações significativas na transparência celular. No entanto, as larvas irradiadas e analisadas 12 horas após a exposição (L1 – L1) demonstraram uma redução na transparência celular em comparação com as larvas não irradiadas ($252,0 \pm 1,5$ e $231,0 \pm 3,2$, $P < 0,0001$) (Figura 1).

3.2. Efeitos da Radiação UVB no Comportamento de Fototropismo

As análises de fototropismo das larvas do primeiro conjunto (E7 – L1) revelaram uma diminuição no número de larvas migrando para o campo iluminado em comparação com as larvas não irradiadas ($30 \pm 0,5$ e $27 \pm 0,5$, $P < 0,05$). Da mesma forma, os dados do segundo conjunto (L1 – L1) indicaram uma redução no número de larvas migrando para o campo iluminado em comparação com as não irradiadas ($29,5 \pm 0,5$ e $24 \pm 1,3$, $P < 0,0001$) (Figura 1).

3.3. Efeitos da Radiação UVB no Índice do Olho

As análises do índice do olho revelaram que as larvas provenientes de embriões expostos à radiação UVB (E7 – L1) apresentaram aumento no índice do olho em comparação com as larvas não irradiadas ($24,1 \pm 1,5$ e $48,76 \pm 6,7$, $P < 0,0001$) (Figura 1). Em contraste, as larvas que foram irradiadas com UVB e analisadas logo após a eclosão (L1 – L1) apresentaram uma diminuição no índice do olho em comparação com as larvas não irradiadas ($23,9 \pm 1,0$ e $7,9 \pm 1,0$, $P < 0,0001$) (Figura1).

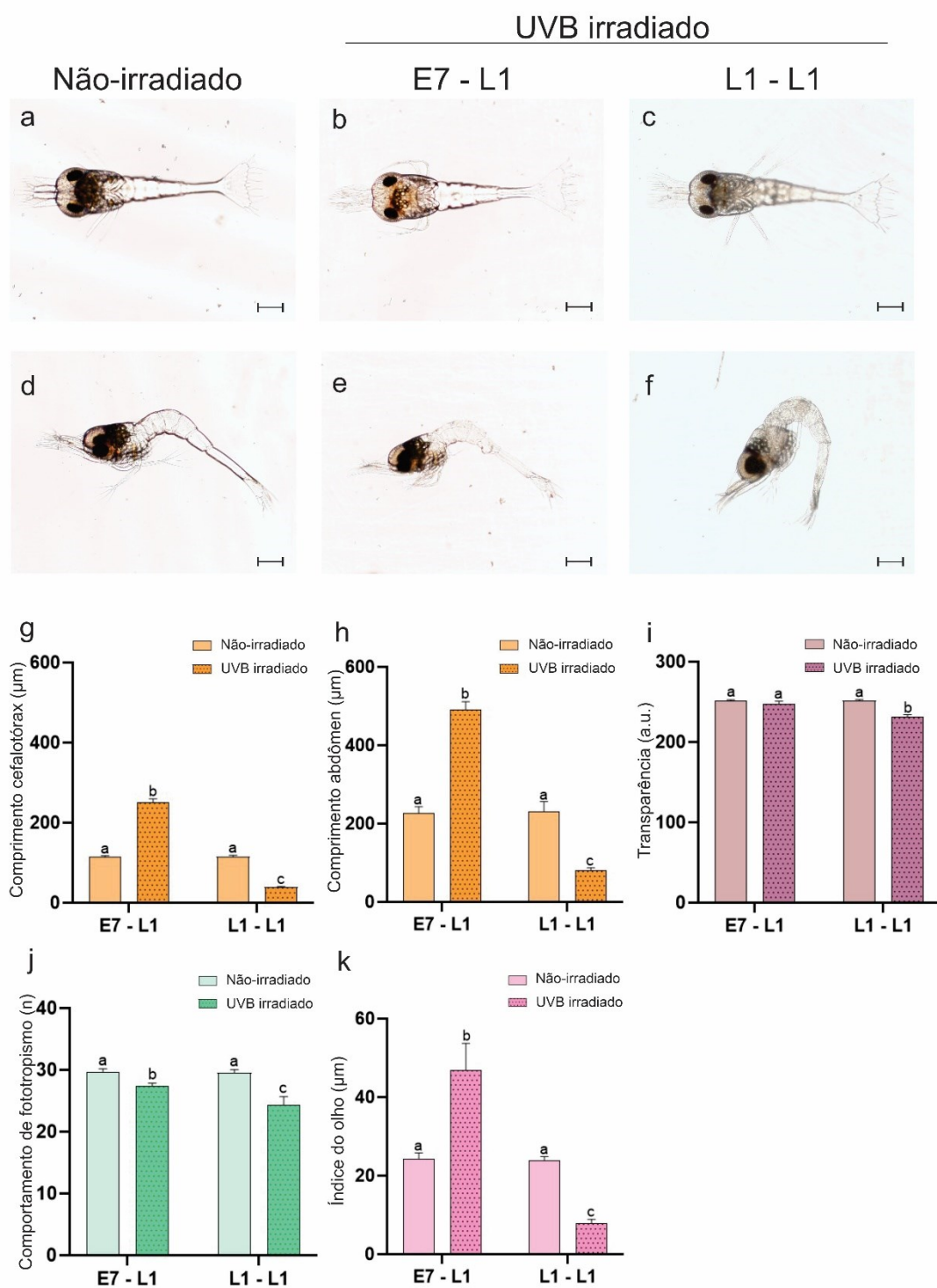


Figura 1: Análise morfológica das larvas. (a) vista dorsal de uma larva não irradiada (a), vista dorsal de uma larva irradiada com UVB do primeiro conjunto (b), vista dorsal de uma larva irradiada com UVB do segundo conjunto (c), vista lateral de uma larva não irradiada (d), vista lateral de uma larva irradiada com UVB do primeiro conjunto (e), vista lateral de uma larva irradiada com UVB do segundo conjunto (f), gráfico do comprimento do cefalotórax (g), gráfico do comprimento do abdômen (h), gráfico da transparência (i), gráfico do comportamento de fototropismo (j), gráfico do índice do olho (k). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,005$) entre larvas irradiadas com UVB e não irradiadas. a.u.: unidades arbitrárias. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Barra de escala: 50 μ m.

3.4. Efeitos da Radiação UVB no Dano ao DNA

O número de células positivas para dímeros de timina por área mostrou aumento na formação desse dano ao DNA em larvas de embriões expostos à radiação UVB em comparação com as não irradiadas (E7 – L1) ($21 \pm 1,13$ e $13 \pm 1,65$, $p < 0,0001$). A análise desse dano em larvas recentemente expostas (L1 – L1) mostrou aumento no número de células quando comparadas às larvas não irradiadas ($28 \pm 1,32$ e $13 \pm 1,33$, $p < 0,0001$) (Figura 2).

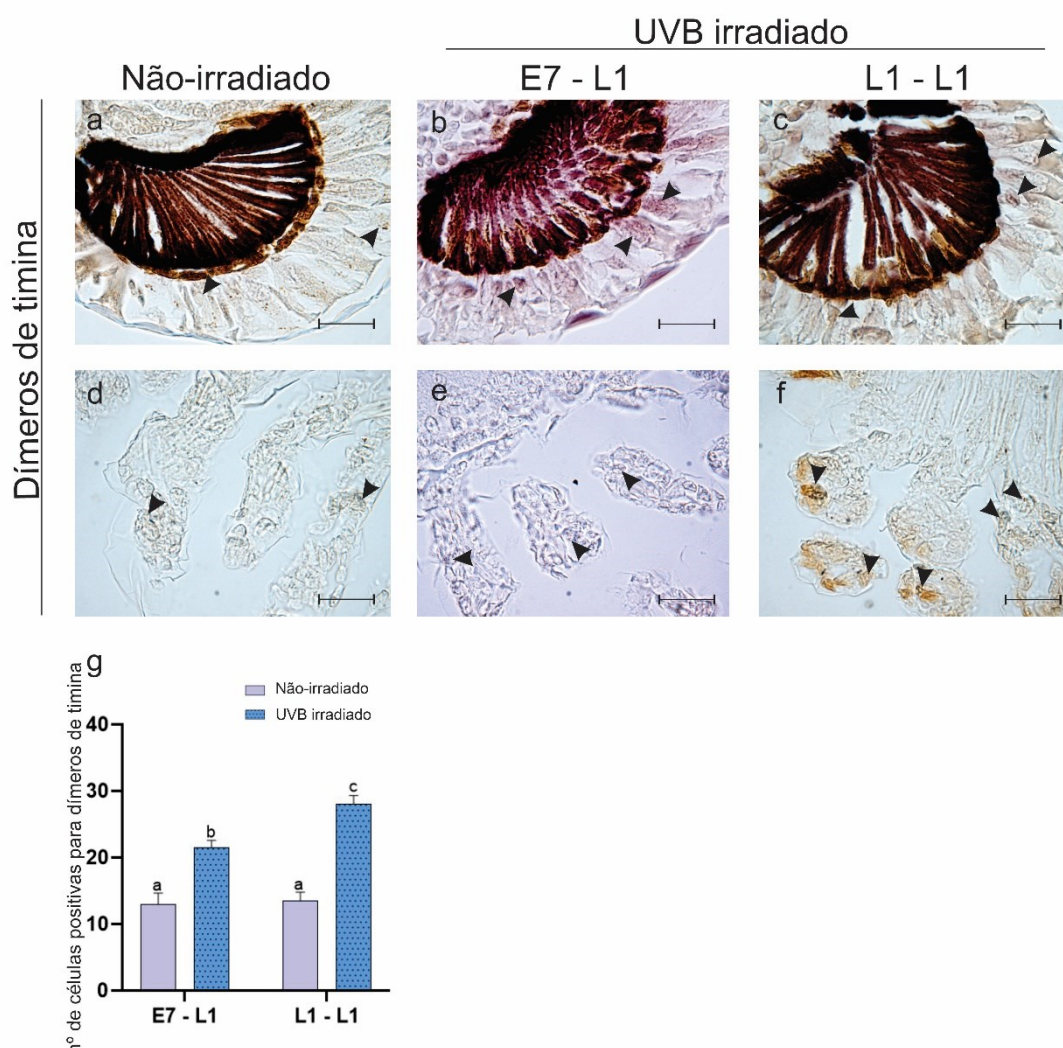


Figura 2: Efeitos da radiação UVB na formação de dímeros de timina em células de larvas de *Macrobrachium olfersii*. Ampliação de células positivas para dímeros de timina (seta preta) em olho de larva não irradiada (a), olho de larva do primeiro conjunto irradiada com UVB (b), olho de larva do segundo conjunto irradiada com UVB (c). Ampliação de células positivas para dímeros de timina (seta preta) em apêndices de larva não irradiada (d), apêndices de larva do primeiro conjunto irradiada com UVB (e), apêndices de larva do segundo conjunto irradiada com UVB (f). O gráfico exibe o número de células positivas para dímeros de timina nas larvas não irradiadas e irradiadas com UVB dos dois conjuntos analisados (g). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as larvas irradiadas com UVB e as não irradiadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Barra de escala: 100 μ m.

3.5. Efeitos da radiação UVB na proliferação celular e apoptose

O número de células positivas para PHH3 por área mostrou diminuição dessa proteína em larvas de embriões expostos à radiação UVB em comparação com as não irradiadas (E7 – L1) ($2 \pm 0,83$ e $3 \pm 0,72$, $p < 0,0001$). Em larvas recentemente expostas (L1 – L1), o número de células positivas mostrou diminuição quando comparado às larvas não irradiadas ($1 \pm 0,52$ e $4 \pm 0,83$, $p < 0,0001$) (Figura 3). O número de células positivas para Caspase3 apresentou aumento em larvas de embriões expostos à radiação UVB em comparação com as não irradiadas (E7 – L1) ($3 \pm 0,66$ e $2 \pm 0,5$, $p < 0,0001$). Em larvas recentemente expostas (L1 – L1), os resultados demonstraram aumento em comparação com as larvas não irradiadas ($5 \pm 0,86$ e $1 \pm 0,52$, $p < 0,0001$) (Figura 3). Esses resultados demonstraram que a radiação UVB induz apoptose e diminui a proliferação celular.

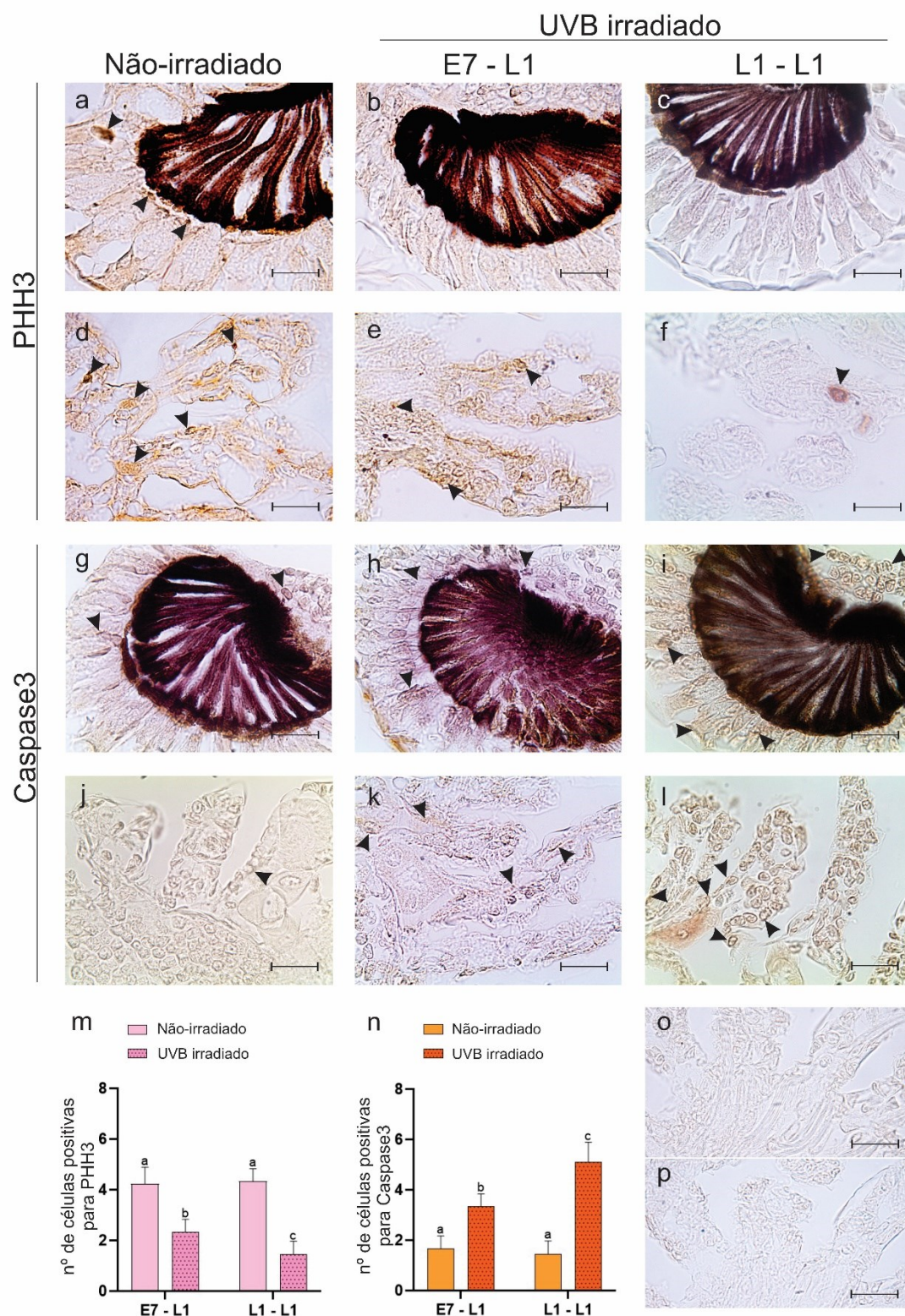


Figura 3: Efeitos da radiação UVB na quantidade total de proteínas PHH3 e Caspase3 em células de larvas de *Macrobrachium olfersii*. Ampliação de células positivas para PHH3 (seta preta) em olho de larva não irradiada (a), olho de larvas irradiadas com UVB do primeiro conjunto (b), olho de larvas irradiadas com UVB do segundo conjunto (c). Ampliação de células positivas para PHH3 (seta preta) em apêndices de larva não irradiada (d), apêndices de larvas irradiadas com UVB do primeiro conjunto (e), apêndices de larvas irradiadas com UVB do segundo conjunto (f). Ampliação de células positivas

para Caspase3 (seta preta) em olho de larva não irradiada (g), olho de larvas irradiadas com UVB do primeiro conjunto (h), olho de larvas irradiadas com UVB do segundo conjunto (i). Ampliação de células positivas para Caspase3 (seta preta) em apêndices de larva não irradiada (j), apêndices de larvas irradiadas com UVB do primeiro conjunto (k), apêndices de larvas irradiadas com UVB do segundo conjunto (l). O gráfico exibe o número de células positivas para PHH3 de larvas não irradiadas e irradiadas com UVB dos dois conjuntos analisados (m). O gráfico exibe o número de células positivas para Caspase3 de larvas não irradiadas e irradiadas com UVB dos dois conjuntos analisados (n). Controle negativo da reação imuno-histoquímica com anti-IgG de camundongo (o). Controle negativo da reação imuno-histoquímica com anti-IgG de coelho (p). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre larvas irradiadas e não irradiadas com UVB. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Barra de escala: 100 μ m.

3.6. Efeitos da Radiação UVB na Indução da Mitofagia

O número de células positivas para TOM20 por área mostrou diminuição dessa proteína, associada à membrana mitocondrial externa, em larvas provenientes de embriões expostos à radiação UVB em comparação às não irradiadas (E7 – L1) ($28 \pm 1,5$ e $27 \pm 0,9$, $p < 0,01$). No entanto, a análise dessa proteína em larvas recentemente expostas (L1 – L1) mostrou um aumento no número de células em comparação às larvas não irradiadas ($29 \pm 1,5$ e $34 \pm 1,3$, $p < 0,0001$) (Figura 4). A contagem de células positivas para PINK1 por área exibiu um aumento na expressão dessa proteína, envolvida na iniciação da mitofagia, em larvas derivadas de embriões expostos à UVB em comparação às não irradiadas (E7 – L1) ($9 \pm 1,2$ e $16,5 \pm 1,4$, $p < 0,0001$). Em larvas recentemente expostas (L1 – L1), o número de células positivas para PINK1 também aumentou em comparação às larvas não irradiadas ($8,5 \pm 1,5$ e $22 \pm 2,8$, $p < 0,0001$) (Figura 4).

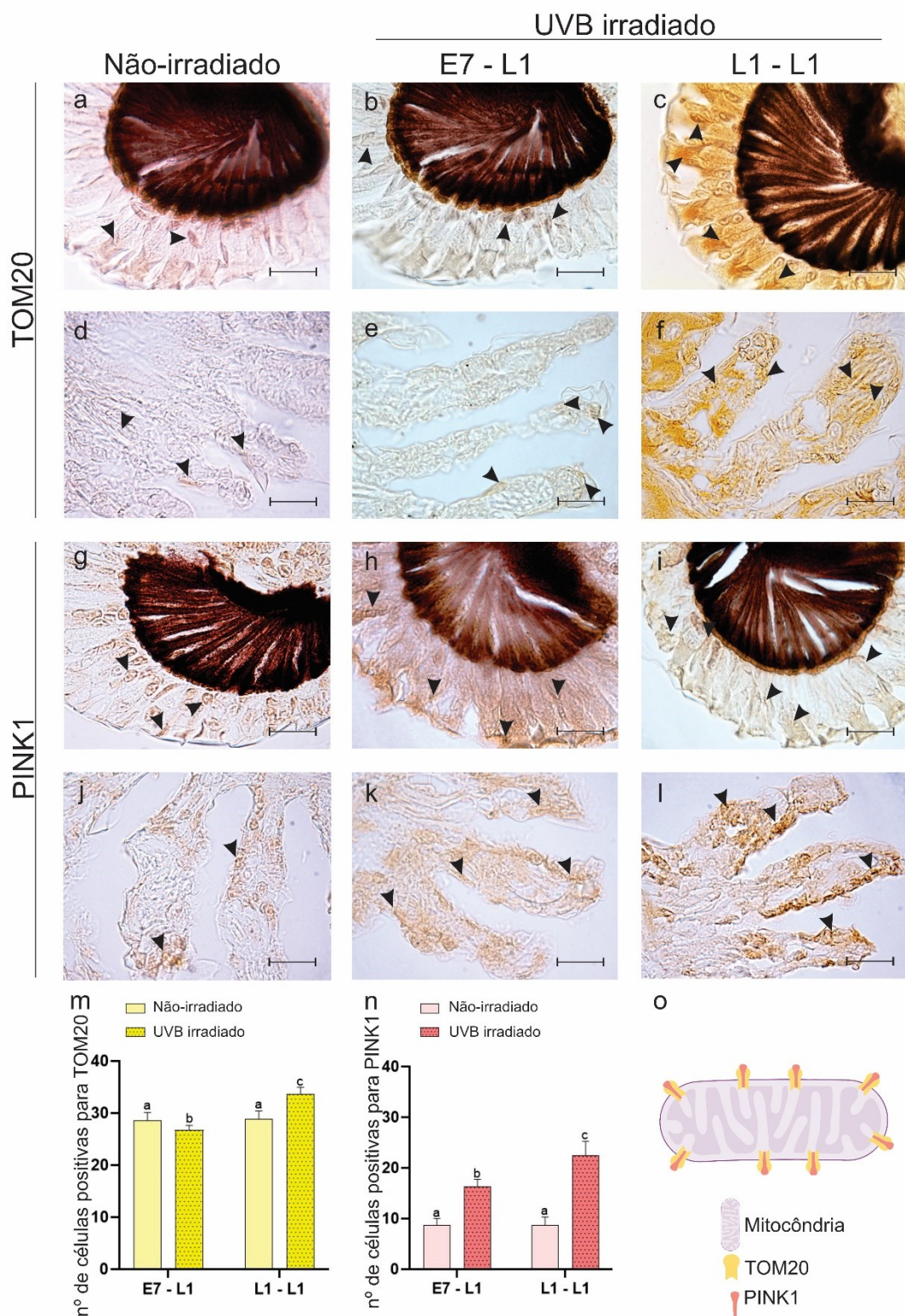


Figura 4: Efeitos da radiação UVB na quantidade total de proteínas TOM20 e PINK1 nas células das larvas de *Macrobrachium olfersii*. Ampliação de células positivas para TOM20 (seta preta) em um olho larval não irradiado (a), olho de larvas do primeiro conjunto irradiadas por UVB (b), olho de larvas do segundo conjunto irradiadas por UVB (c). Ampliação de células positivas para TOM20 (seta preta) em apêndices larvais não irradiados (d), apêndices larvais do primeiro conjunto irradiados por UVB (e), apêndices larvais do segundo conjunto irradiados por UVB (f). Ampliação de células positivas para PINK1 (seta preta) em um olho larval não irradiado (g), olho de larvas do primeiro conjunto irradiadas

por UVB (h), olho de larvas do segundo conjunto irradiadas por UVB (i). Ampliação de células positivas para PINK1 (seta preta) em apêndices larvais não irradiados (j), apêndices larvais do primeiro conjunto irradiados por UVB (k), apêndices larvais do segundo conjunto irradiados por UVB (l). O gráfico exibe o número de células positivas para TOM20 de larvas não irradiadas e irradiadas por UVB dos dois conjuntos analisados (m). O gráfico exibe o número de células positivas para PINK1 das larvas não irradiadas e irradiadas por UVB dos dois conjuntos analisados (n). Desenho esquemático mostrando a ligação de PINK1 a TOM20 na membrana mitocondrial externa (o). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre larvas irradiadas por UVB e não irradiadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Barra de escala: 100 μ m.

A contagem de células positivas para p62 por área exibiu um aumento na expressão dessa proteína, em larvas derivadas de embriões expostos à radiação UVB em comparação com as não irradiadas (E7 – L1) ($10,5 \pm 2,7$ e $19 \pm 2,8$, $p < 0,0001$) (Figura 5). Em larvas recentemente expostas (L1 – L1), o número de células positivas para PINK1 também aumentou quando comparado às larvas não irradiadas ($10 \pm 3,6$ e $27 \pm 1,8$, $p < 0,0001$) (Figura 5). O número de células positivas para LC3B por área mostrou um aumento dessa proteína em larvas de embriões expostos à radiação UVB em comparação com as não irradiadas (E7 – L1) ($12 \pm 1,9$ e $20,5 \pm 2,5$, $p < 0,0001$) (Figura 5). E a análise dessa proteína em larvas recentemente expostas (L1 – L1) também mostrou um aumento no número de células positivas para LC3B quando comparadas às não irradiadas ($15 \pm 2,4$ e $29 \pm 4,6$, $p < 0,0001$) (Figura 5).

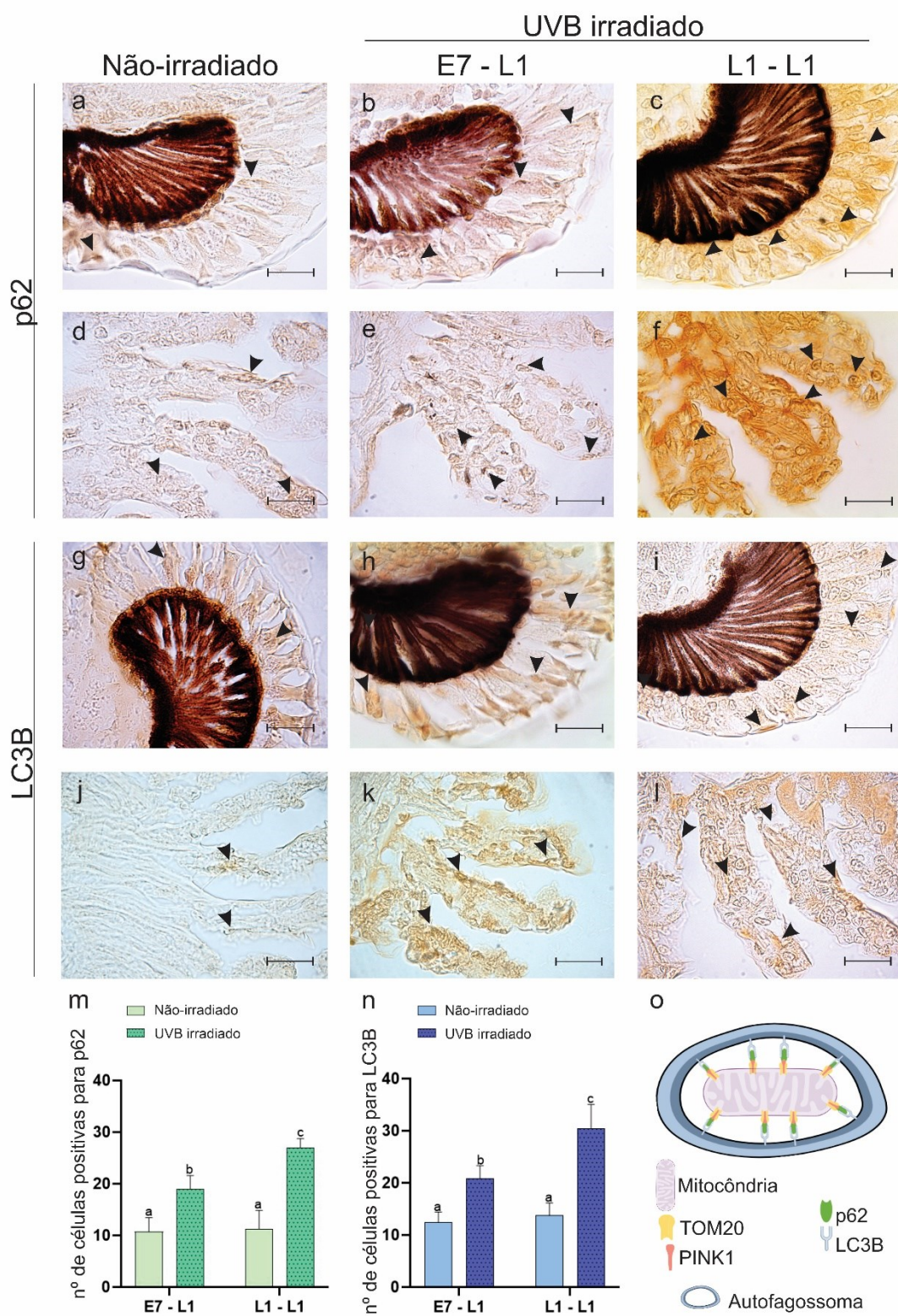


Figura 5: Efeitos da radiação UVB na quantidade total das proteínas p62 e LC3B nas células das larvas de *Macrobrachium olfersii*. Alta magnificação de células positivas para p62 (seta preta) em um olho larval não irradiado (a), olho de larvas do primeiro conjunto irradiadas por UVB (b), olho de larvas do segundo conjunto irradiadas por UVB (c). Alta magnificação de células positivas para p62 (seta preta) em apêndices larvais não irradiados (d), apêndices larvais do primeiro conjunto irradiados por UVB (e), apêndices larvais do segundo conjunto irradiados por UVB (f). Alta magnificação de células positivas para LC3B (seta preta) em um olho larval não irradiado (g), olho de larvas do primeiro conjunto

irradiadas por UVB (h), olho de larvas do segundo conjunto irradiadas por UVB (i). Alta magnificação de células positivas para LC3B (seta preta) em apêndices larvais não irradiados (j), apêndices larvais do primeiro conjunto irradiados por UVB (k), apêndices larvais do segundo conjunto irradiados por UVB (l). O gráfico exibe o número de células positivas para p62 nas larvas não irradiadas e irradiadas por UVB dos dois conjuntos analisados (m). O gráfico exibe o número de células positivas para LC3B nas larvas não irradiadas e irradiadas por UVB dos dois conjuntos analisados (n). Desenho esquemático mostrando a ligação de PINK1 ao TOM20 na membrana mitocondrial externa, o reconhecimento de p62 pelo PINK1 e a adesão entre p62 e LC3B na membrana do autofagossomo (o). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre larvas irradiadas por UVB e não irradiadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. Barra de escala: 100 μ m.

4. Discussão

Os comprimentos de onda da radiação UVB penetram na superfície da Terra, representando uma ameaça significativa à integridade celular e aos processos fisiológicos de numerosas espécies [40, 41, 42]. Na década de 1990, as pesquisas começaram a se concentrar no impacto da radiação UVB nas células de várias espécies animais, particularmente em organismos de água doce [43]. Muitos crustáceos habitam águas claras e rasas, onde as ondas UVB os alcançam, comprometendo não apenas os adultos, mas também embriões e larvas, prejudicando assim o ciclo de vida dessas espécies [42, 44].

A exposição à radiação UVB é reconhecida por induzir anomalias no desenvolvimento em uma ampla gama de organismos, particularmente em espécies aquáticas [32, 45]. Vários estudos focando em embriões de *M. olfersii* destacaram os efeitos deletérios da exposição à radiação UVB, incluindo a indução de danos ao DNA através da formação de dímeros de timina, a interrupção da dinâmica mitocondrial promovendo a fissão e inibindo a fusão, a indução de apoptose, a diminuição da proliferação celular e o comprometimento da matriz extracelular [17, 28, 29, 35]. Notavelmente, alterações na dinâmica mitocondrial podem desencadear a mitofagia, um mecanismo crucial para a manutenção do controle de qualidade mitocondrial [46].

Para avaliar o impacto da radiação UVB na morfologia larval, analisamos o comprimento do corpo (cefalotórax e abdômen), bem como o índice do olho. A exposição à radiação UVB teve um efeito significativo no comprimento do corpo dos dois conjuntos analisados. Pahkala *et al.* [47] realizaram um estudo em larvas de anfíbios derivadas de embriões expostos à radiação UVB, destacando a importância crucial de explorar a possibilidade dos efeitos remanescentes da radiação UVB das fases embrionárias para as larvais. O trabalho deles enfatiza especificamente a investigação desses efeitos na morfologia larval, nas taxas de sobrevivência e no comprimento do corpo. Curiosamente, a análise de Pahkala *et al.* [47], revelou que,

entre as larvas derivadas de embriões submetidos a duas diferentes doses de radiação UVB, uma das doses levou a um aumento notável no comprimento do corpo, demonstrando os efeitos sutis da exposição à UVB no desenvolvimento de anfíbios. De maneira semelhante, Wang *et al.* [48] expuseram embriões de crustáceos e analisaram o crescimento corporal pós-eclosão, parâmetros reprodutivos e tamanho da população. Os dados de Wang *et al.* [48], demonstraram que a UVB induziu crescimento corporal em indivíduos com diferentes doses de UVB em comparação ao grupo controle. Nossos dados demonstram que as larvas cujos embriões foram expostos mostraram um aumento significativo no comprimento do corpo (primeiro conjunto), tanto para o cefalotórax quanto para o abdômen, assim como para o índice do olho. As medições do índice do olho indicaram um aumento, alinhando-se de perto com as descobertas relatadas por Müller *et al.* [49] sobre embriões de *M. olfersii* no último dia de desenvolvimento. Em nosso estudo, também encontramos que as larvas que não foram expostas à radiação UVB durante o desenvolvimento, mas foram irradiadas após a eclosão e analisadas 12 horas após a exposição (segundo conjunto), apresentaram uma diminuição nas medições tanto do comprimento do corpo quanto do índice ocular, resultado semelhante obtido por Moresino *et al.* [50].

Numerosas espécies de crustáceos exibem fotoreceptores e um comportamento de fototropismo, permitindo-lhes discernir habitats apropriados para alimentação e assentamento [51, 52]. Aqui, demonstramos que a radiação UVB induziu danos oculares nas larvas de *M. olfersii*, o que pode comprometer o comportamento de fototropismo. De acordo com Chiang *et al.* [53], interrupções significativas nos rabdomeros (as estruturas fotossensíveis nas quais ocorre a fototransdução) induzidas pela exposição à radiação UVB ocorreram nas células dos olhos naupliares das larvas, prejudicando suas respostas fotográficas e o sucesso do assentamento. A diminuição observada no índice ocular pode estar relacionada à redução no número de larvas que não conseguiram migrar em direção ao campo iluminado.

Além do comprimento do corpo e do índice do olho diminuídos, as larvas do segundo conjunto apresentaram alterações morfológicas, como aumento na curvatura do corpo. Resultados semelhantes foram observados em várias espécies de peixes e rãs, onde essa notável curvatura é referida como lordose [54, 55]. Muitos camarões e camarões adultos (incluindo espécies de *Macrobrachium*) produzem pulsos de natação fortes usando o telson (resposta de fuga do flip de cauda) em resposta a

predadores [56]. Esse comportamento muito comum se desenvolve bastante cedo [33] e pode ser afetado por estressores naturais. As larvas de *M. olfersii* apresentaram um aumento considerável na curvatura do corpo, o que pode estar relacionado à diminuição do comprimento do corpo, comprometendo as respostas larvais. Além da curvatura do corpo, observamos opacidade celular nas larvas do segundo conjunto, alinhando-se com as descobertas relatadas por Santos *et al.* [35] sobre a matriz extracelular dos embriões de *M. olfersii*.

Demonstramos que a radiação UVB causa danos ao DNA nas células larvais de *M. olfersii*, através da formação de dímeros de timina. Esse dano induzido pela UVB pode comprometer o ciclo celular, como mostrado por Zeni *et al.* [28] em células embrionárias de *M. olfersii*. O aumento nos danos ao DNA e na caspase 3 indica que esse dano não foi reparado e pode ter ativado a apoptose para eliminar as células com danos no DNA [57, 58, 59]. Em contraste, a diminuição nas células positivas para PHH3 sugere que o dano ao DNA prejudicou o ciclo celular, levando à apoptose [58, 60].

Eventos celulares, como proliferação, diferenciação, apoptose e mitofagia, foram documentados na literatura como processos inerentes ao desenvolvimento embrionário e larval [61, 62, 63, 64]. Esses eventos desempenham papéis cruciais durante as etapas de desenvolvimento de vários organismos, assegurando a formação e funcionalidade adequadas de tecidos e órgãos [61, 62, 65, 66]. Embora esses eventos celulares sejam cruciais para a embriogênese, a exposição à radiação UVB pode comprometer esses processos, levando a um desenvolvimento anômalo.

Nossos resultados sobre o processo de mitofagia também mostraram um aumento para as três proteínas analisadas (PINK1, p62 e LC3B) no primeiro conjunto, em que os embriões foram expostos e as larvas analisadas logo após a eclosão. Esses dados mostraram que os danos celulares que levaram à mitofagia permaneceram ativos nas células embrionárias durante os sete dias embrionários subsequentes até a eclosão. Embora a mitofagia seja um evento constitutivo durante o desenvolvimento em várias espécies, incluindo *M. olfersii*, ela também pode ser induzida pela exposição à radiação UVB [36, 67]. A superexpressão dessas três proteínas (PINK1, p62 e LC3B) está relacionada ao dano mitocondrial induzido pela radiação UVB [17], o que pode levar à reciclagem dessa organela. Esses danos mitocondriais podem ser carregados através do desenvolvimento e das fases larvais, o que pode explicar por que as larvas

cujos embriões foram irradiados ainda apresentaram um número elevado de células positivas para as três proteínas analisadas e, como discutido por Bouchard *et al.* [68], esses efeitos remanescentes podem influenciar os juvenis e ter consequências importantes para a aptidão.

Também quantificamos as células positivas para TOM20, e os resultados mostraram uma diminuição no primeiro conjunto analisado, o que pode estar relacionado à degradação mitocondrial através da ativação da mitofagia [69]. Nesse caso, podemos correlacionar esse resultado com os efeitos remanescentes das células embrionárias para as células larvais. TOM20 diminuiu e PINK1, p62 e LC3B aumentaram, indicando degradação mitocondrial ativa ocorrendo nas células larvais do primeiro conjunto. No segundo conjunto, as larvas irradiadas e analisadas 12 horas após a exposição à UVB apresentaram um aumento nas células positivas para TOM20 e, de acordo com Bingol *et al.* [70], a superexpressão de TOM20 promove mitofagia ao aumentar o pool de substratos disponíveis para ubiquitinação. Esses dados são os mesmos obtidos para embriões de *M. olfersii* por Schramm *et al.* [29] e Strücker *et al.* [36], que mostraram a cronologia da expressão gênica e do conteúdo de proteínas para apoptose e mitofagia. Da mesma forma que TOM20, também quantificamos um aumento nas células positivas para PINK1, p62 e LC3B no segundo conjunto. O aumento no número de células positivas para as quatro proteínas analisadas indica degradação mitocondrial ativa nas células larvais [71].

O corpo das larvas é dividido em cefalotórax e abdômen. O cefalotórax possui apêndices, incluindo um par de antenas e antenulas (receptores para estímulos ambientais), mandíbulas, maxilas, três maxilípedes (que auxiliam na alimentação) e pereópodes (importantes para a locomoção) [27]. O abdômen, composto por seis segmentos, não possui apêndices. Curiosamente, observamos um número maior de células positivas para as proteínas analisadas nos apêndices das larvas, o que poderia comprometer a função dos pereópodes e, consequentemente, prejudicar a locomoção. Nossos dados proteicos, combinados com as alterações morfológicas observadas, podem explicar as mudanças no comportamento de fototropismo. Aranda *et al.* [72] demonstraram que a exposição à radiação UVB induziu apoptose e comprometeu o comportamento de fototropismo na fase planctônica das larvas de coral.

Os crustáceos, que abrangem uma variedade diversificada de espécies, desde camarões até caranguejos, habitam uma variedade de ambientes aquáticos em todo o mundo. Nesses habitats, estão expostos a diversos estressores ambientais, incluindo a radiação UVB. Compreender como essa radiação afeta os crustáceos em níveis morfológico e celular é crucial para compreender suas respostas ecológicas e adaptações evolutivas à luz das mudanças ambientais em curso. Juntos, esses resultados celulares e morfológicos demonstram que a exposição à radiação UVB nas larvas de *M. olfersii* pode comprometer o tamanho do corpo e do olho, a migração larval e a transparência do corpo, o que pode afetar o desempenho larval, levando à suscetibilidade a predadores e comprometendo a população.

5. Conclusão

Nossos resultados demonstram que a radiação UVB induziu alterações morfológicas na estrutura do corpo, no índice do olho e na transparência celular nas larvas de *M. olfersii*. Como esperado, essa exposição também comprometeu o comportamento de fototropismo, induziu a formação de dímeros de timina e alterou os conteúdos proteicos de PHH3, caspase3, TOM20, PINK1, p62 e LC3B. Juntos, esses achados destacam as respostas das células larvais para mitigar os efeitos da exposição à radiação UVB. Este estudo apresenta os primeiros resultados sobre o impacto da UVB nas células larvais de *M. olfersii*, contribuindo para a compreensão dos diversos efeitos dessa radiação em espécies aquáticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório Multiusuário de Biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina, assim como às fontes de financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaração de contribuição dos autores CRediT

Giuliam Kátia Strücker: Redação – rascunho original, Validação, Metodologia, Investigação, Análise formal, Concepção, Curadoria de dados. Evelise Maria Nazari: Redação – revisão e edição, Supervisão, Administração de projeto, Aquisição de financiamento, Concepção.

Fontes de financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brasil (Universal 433094/2018-4), Brasil. G.K. Strücker foi beneficiária da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES/Brasil. E.M. Nazari é beneficiária da bolsa de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brasil (311570/2020-8).

Disponibilidade dos dados

Os dados estarão disponíveis mediante solicitação.

Referências

- [1] Crutzen, P. J. (1974). Estimates of possible variations in total ozone due to natural causes and human activities. *Ambio*, 3, 201-210.
- [2] Diffey, B. L. (1991). Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine & Biology*, 36, 299 - 328.
- [3] Egorova, T., E. Rozanov, P. Arsenovic, T. Sukhodolov (2020). Ozone layer evolution in the early 20th century. *Atmosphere*, 11, 169-182.
- [4] Williamson, C. E., P. J. Neale, S. Hylander, K. C. Rose, F. L. Figueroa, S. A. Robinson, D. P. Häder, S. A. Wängberg, R. C. Worrest (2019). The interactive effects of stratospheric ozone depletion, UV radiation, and climate change on aquatic ecosystems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18, 717-746.
- [5] Häder, D. P., E. W. Helbling, C. E. Williamson, R. C. Worrest (2011). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10, 242-260.
- [6] Neville, J. J., T. Palmieri, A. R. Young (2021). Physical determinants of vitamin D photosynthesis: a review. *Journal of Bone and Mineral Research Plus*, 5, e10460.
- [7] Ljubic, A., E. T. Thulesen, C. Jacobsen, J. Jakobsen (2021). UVB exposure stimulates production of vitamin D3 in selected microalgae. *Algal Research*, 59, 102472.
- [8] Vergneau-Grosset, C., F. Péron (2020). Effect of ultraviolet radiation on vertebrate animals: update from ethological and medical perspectives. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19, 752-762.

- [9] Häder, D. P., M. Häder (1990). Effects of UV radiation on motility, photo-orientation and pigmentation in a freshwater *Cryptomonas*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 5, 105-114.
- [10] Penacchio, O., I. C. Cuthill, P. G. Lovell, G. D. Ruxton, J. M. Harris (2015). Orientation to the sun by animals and its interaction with crypsis. *Functional Ecology*, 29, 1165-1177.
- [11] Sinha, R. P., D. P. Häder (2002). Life under solar UV radiation in aquatic organisms. *Advances in Space Research*, 30, 1547-1556.
- [12] Bancroft, B. A., N. J. Baker, A. R. Blaustein (2007). Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecology Letters*, 10, 332-345.
- [13] Gouveia, G. R., G. S. Trindade, L. E. M. Nery, J. H. Muelbert (2015). UVA and UVB penetration in the water column of a South West Atlantic warm temperate estuary and its effects on cells and fish larvae. *Estuaries and Coasts*, 38, 1147-1162.
- [14] Matsunaga, T., K. Hieda, O. Nikaido (1991). Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. *Photochemistry and Photobiology*, 54, 403-410.
- [15] Ravanat, J. L., T. Douki, J. Cadet (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63, 88-102.
- [16] Fraikin, G. Y., N. S. Belenikina, A. B. Rubin (2024). Photochemical Processes of Cell DNA Damage by UV Radiation of Various Wavelengths: Biological Consequences. *Molecular Biology*, 58, 1-16.
- [17] Quadros, T., H. Schramm, E. C. Zeni, C. Simioni, S. Allodi, S., Y. M. R. Müller, D. Ammar, E. M. Nazari (2016). Developmental effects of exposure to ultraviolet B radiation on the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi*: Mitochondria as a target of environmental UVB radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 279-287.
- [18] He, H., L. Xiong, L. Jian, L. Li, Y. Wu, S. Qiao (2022). Role of mitochondria on UV-induced skin damage and molecular mechanisms of active chemical compounds

targeting mitochondria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 232, 112464.

- [19] Hudson, L., E. Rashdan, C. A. Bonn, B. Chavan, D. Rawlings, M. A. Birch-Machin (2020). Individual and combined effects of the infrared, visible, and ultraviolet light components of solar radiation on damage biomarkers in human skin cells. *The FASEB Journal*, 34, 3874.
- [20] Siekevitz, P (1957). Powerhouse of the cell. *Scientific American*, 197, 131-144.
- [21] Yoo, S. M., Y. K. Jung (2018). A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Molecules and Cells*, 41, 18-26.
- [22] Youle, R. J., D. P. Narendra (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 9-14.
- [23] Zhang, C., X. Gao, M. Li, X. Yu, F. Huang, Y. Wang, Y. Yan, H. Zhang, Y. Shi, X. He (2023). The role of mitochondrial quality surveillance in skin aging: focus on mitochondrial dynamics, biogenesis and mitophagy. *Ageing Research Reviews*, 101917.
- [24] Müller, Y. M. R., E. M. Nazari, D. Ammar, E. Cargnin Ferreira, I. T. Beltrame, C. Pacheco (1999). Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratones, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16, 629-636.
- [25] Nazari, E. M., D. Ammar, A. F. Bem, A. Latini, Y. M. R. Müller, S. Allodi (2010). Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquatic Toxicology*, 98, 25-33.
- [26] Simões-Costa, M. S., C. Pacheco, E. M. Nazari, Y. M. R. Müller, D. Ammar (2005). Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman)(Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22, 501-508.
- [27] Dugger, D. M., S. Dobkin (1975). A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 29, 1-30.
- [28] Zeni, E. C., D. Ammar, M. L. Leal, H. S. Silva, S. Allodi, Y. M. R. Müller, E. M. Nazari (2015). Light-mediated DNA repair prevents UVB-induced cell cycle arrest in embryos of the crustacean *Macrobrachium olfersi*. *Photochemistry and Photobiology*, 91, 869-878.

- [29] Schramm, H., M. L. Jaramillo, T. Quadros, E. C. Zeni, Y. M. R. Mueller, D. Ammar, E. M. Nazari (2017). Effect of UVB radiation exposure in the expression of genes and proteins related to apoptosis in freshwater prawn embryos. *Aquatic Toxicology*, 191, 25-33.
- [30] Hovel, K. A., S. G. Morgan (1999). Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 237, 107-125.
- [31] Zhang, H., B. Zhu, L. Yu, F. Wang (2022). Shelter Color Selection of Juvenile Swimming Crabs (*Portunus trituberculatus*). *Fishes*, 7, 296-308.
- [32] Lesser, M. P., T. M. Barry (2003). Survivorship, development, and DNA damage in echinoderm embryos and larvae exposed to ultraviolet radiation (290–400 nm). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292, 75-91.
- [33] Almeida, E. V. D., C. D. S. Cardoso, M. D. S., Souza, S. L. C Bonecker (2021). Swimming behavior of newly hatched larvae of six decapod species (Crustacea: Decapoda). *Nauplius*, 29, e2021023.
- [34] Neil, D. M., A. D. Ansell (1995). The orientation of tail-flip escape swimming in decapod and mysid crustaceans. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75, 55-70.
- [35] Santos, T. P. G., M. S. Melo, H. Schramm, Y. M. R. Müller, M. L. Jaramillo, E. M. Nazari (2020). Ultraviolet-B radiation induces transcriptional modulation of components associated with the extracellular matrix in embryos of decapod *Macrobrachium olfersii*. *Aquatic Toxicology*, 222, 105468.
- [36] Strücker, G. K., M. L. Jaramillo, T. Quadros, E. M. Nazari (2024). UVB radiation exposure modulates mitophagy in embryonic cells of freshwater prawns *Macrobrachium olfersii*: Exploring a protective organelle quality control mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 111664.
- [37] Galiano, P. G. (2011). Efecto del fototropismo en larvas y juveniles de artemia (*Artemia franciscana*, Kellogg, 1906). *Anales Universitarios de Etología*, 5, 1-14.
- [38] Perkins, H. C. (1972). Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne Edwards). *Fish. Bull*, 70, 95-99.
- [39] Freere, R. H., E. R. Weibel (1967). Stereologic techniques in microscopy. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 87, 25-34.

- [40] Gonzalez, V. C., A. C. Beheregaray, B. M. Peres, E. S. Sallis, A. S. Varela Junior, G. S. Trindade (2015). Histopathological analysis of UVB and IR interaction in rat skin. *Photochemistry and Photobiology*, 91, 895-900.
- [41] Nuñez, E., C. Sobrino, P. J. Neale, R. M. Ceinos, S. Du, J. Rotllant (2012). Molecular response to ultraviolet radiation exposure in fish embryos: implications for survival and morphological development. *Photochemistry and Photobiology*, 88, 701-707.
- [42] Núñez-Pons, L., C. Avila, G. Romano, C. Verde, D. Giordano (2018). UV-protective compounds in marine organisms from the Southern Ocean. *Marine Drugs*, 16, 336.
- [43] Williamson, C. E. (1995). What role does UV-B radiation play in freshwater ecosystems? *Limnology and Oceanography*, 40, 386-392.
- [44] Pasparakis, C., Y. Wang, J. D. Stieglitz, D. D. Benetti, M. Grosell (2019). Embryonic buoyancy control as a mechanism of ultraviolet radiation avoidance. *Science of the Total Environment*, 651, 3070-3078.
- [45] Peng, S., H. Liao, T. Zhou, S. Peng (2017). Effects of UVB radiation on freshwater biota: A meta-analysis. *Global Ecology and Biogeography*, 26, 500-510.
- [46] Twig, G., O. S. Shirihai (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14, 1939-1951.
- [47] Pahkala, M., A. Laurila, J. Merilä (2001). Carry-over effects of ultraviolet-B radiation on larval fitness in *Rana temporaria*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268, 1699-1706.
- [48] Wang, M., W. Zhao, J. Wei, S. Wang, X. Xie (2019). Acute effects of UVB radiation on the survival, growth, development, and reproduction of *Daphniopsis tibetana* Sars (Crustacea: Cladocera). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 10916-10925.
- [49] Müller, Y. M. R., T. Quadros, H. Schramm, V. M. C. Weiss, E. C. Zeni, E. M. N. Nazari, D. Ammar (2018). Biometrical and morphological analyses of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836)(Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) embryos exposed to UVA and UVB radiation. *Nauplius*, 26, e2018013.

- [50] Moresino, R. D. H., R. J. Gonçalves, E. W. Helbling (2011). Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407, 363-369.
- [51] Forward Jr, R. B., C. U. Buswell (1989). A comparative study of behavioural responses of larval decapod crustaceans to light and pressure. *Marine and Freshwater Behaviour & Phy*, 16, 43-56.
- [52] Yamamoto, T., K. Sakuma, A. Yoshikawa, Y. Igeta, K. Hamasaki (2022). Changes in phototaxis, geotaxis, and sinking velocity in relation to larval development of snow crab (*Chionoecetes opilio*) and red snow crab (*Chionoecetes japonicus*) under laboratory conditions. *Aquatic Ecology*, 56, 1099-1111.
- [53] Chiang, W. L., D. W. Au, P. K. Yu, R. S. Wu (2003). UV-B damages eyes of barnacle larvae and impairs their photoresponses and settlement success. *Environmental Science & Technology*, 37, 1089-1092.
- [54] Worrest, R. C., D. J. Kimeldorf (1976). Distortions in amphibian development induced by ultraviolet-B enhancement (290–315 nm) of a simulated solar spectrum. *Photochemistry and Photobiology*, 24, 377-382.
- [55] Sayed, A. E. D. H., H. Mitani (2016). The notochord curvature in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as a response to ultraviolet A irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164, 132-140.
- [56] Arnott, S. A., D. M. Neil, A. D. Ansell (1998). Tail-flip mechanism and size-dependent kinematics of escape swimming in the brown shrimp *Crangon crangon*. *Journal of Experimental Biology*, 201, 1771-1784.
- [57] Norbury, C. J., B. Zhivotovsky (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23, 2797-2808.
- [58] Wang, J. Y. J. (2001). DNA damage and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 8, 1047-1048.
- [59] Zio, D., V. Cianfanelli, F. Cecconi (2013). New insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19, 559-571.
- [60] Molinuevo, R., A. Freije, L. Contreras, J. R. Sanz, A. Gandarillas (2020). The DNA damage response links human squamous proliferation with differentiation. *Journal of Cell Biology*, 219, e202001063.

- [61] Brill, A., A. Torchinsky, H. Carp, V. Toder (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16, 512-519.
- [62] Mishra, P., D. C. Chan (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 634-646.
- [63] Sadler, T. W. (2021). *Langman Embriologia Médica* (14th ed.). Grupo GEN.
- [64] Yildirim, R. M., E. Seli (2024). The role of mitochondrial dynamics in oocyte and early embryo development. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, 159, 52-61.
- [65] Meier, P., A. Finch, G. Evan (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- [66] Voss, A. K., A. Strasser (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9.
- [67] Palikaras, K., E. Lionaki, N. Tavernarakis (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature Cell Biology*, 20, 1013-1022.
- [68] Bouchard, S. S., C. J. O'Leary, L. J. Wargelin, J. F. Charbonnier, K. M. Warkentin (2016). Post-metamorphic carry-over effects of larval digestive plasticity. *Functional Ecology*, 30, 379-388.
- [69] Gehrke, S., Z. Wu M. Klinkenberg, Y. Sun, G. Auburger, S. Guo, B. Lu (2015). PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane. *Cell Metabolism*, 21, 95-108.
- [70] Bingol, B., J. S. Tea, L. Phu, M. Reichelt, C. E. Bakalarski, Q. Song, O. Foreman, D. S. Kirkpatrick, M. Sheng (2014). The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature*, 510, 370-375.
- [71] Onishi, M., K. Yamano, M. Sato, N. Matsuda, K. Okamoto (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, 40, e104705.
- [72] Aranda, M., A. T. Banaszak, T. Bayer, J. R. Luyten, M. Medina, C. R. Voolstra (2011). Differential sensitivity of coral larvae to natural levels of ultraviolet radiation during the onset of larval competence. *Molecular Ecology*, 20, 2955-2972.

6. CONCLUSÕES DA TESE

Os dados gerados nesta tese permitiram chegar às seguintes conclusões sobre o efeito da radiação UVB em embriões e larvas de *M. olfersii*:

- Os genes *Tom20*, *Opa1*, *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3b*, envolvidos no processo mitofágico, são evolutivamente conservados entre espécies de crustáceos.

- O processo mitofágico, regulado pelos genes *Tom20*, *Opa1*, *Pink1*, *Prkn*, *Sqstm1* e *Map1lc3b*, são modulados ao longo do desenvolvimento embrionário de *M. olfersii* e superexpressos após a exposição à radiação UVB.

- Embriões e larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB ativam o processo mitofágico por meio da atividade das proteínas TOM20, PINK1, SQSTM1/p62 e LC3B;

- As larvas de *M. olfersii* expostas à radiação UVB apresentam aumento em células positivas para dano ao DNA e apoptose, diminuição em células proliferativas, comprometimento do índice do olho, da transparência celular e do comportamento de fototropismo positivo.

Os resultados obtidos ressaltam a importância de avaliar os efeitos da radiação UVB em embriões e larvas de organismos aquáticos, levando em conta suas alterações morfológicas externas, comportamentais e as respostas celulares e moleculares. É importante destacar que *M. olfersii* desempenha um papel crucial na ciclagem de energia dos ambientes aquáticos, e níveis elevados de radiação UVB podem comprometer o desenvolvimento dessa espécie, impactando tanto a população quanto o meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., Galy, V. (2011). Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 334, 1144-1147.
- Alves, R. N., Agusti, S. (2020). Effect of ultraviolet radiation (UVR) on the life stages of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 30, 335-372.
- Alves, R. N., Justo, M. S., Laranja, J. L. Q., Alarcon, J. F., Al Suwailem, A., Agusti, S. (2021). Exposure to natural ultraviolet B radiation levels has adverse effects on growth, behavior, physiology, and innate immune response in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 533, 736215.
- Alves, R. N., Mahamed, A. H., Alarcon, J. F., Al Suwailem, A., Agustí, S. (2020). Adverse effects of ultraviolet radiation on growth, behavior, skin condition, physiology, and immune function in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Frontiers in Marine Science*, 7, 306.
- Ammar, D., Müller, Y. M. R., Nazari, E. M. (2001). Reproductive biology of *Macrobrachium olfersii* (Wiegman)(Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) collected at Santa Catarina's Island, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18, 529-537.
- Araújo, M. J., Quintaneiro, C., Soares, A. M., Monteiro, M. S. (2021). Effects of ultraviolet radiation to *Solea senegalensis* during early development. *Science of the Total Environment*, 764, 142899.
- Auerswald, L., Freier, U., Lopata, A., Meyer, B. (2008). Physiological and morphological colour change in Antarctic krill, *Euphausia superba*: a field study in the Lazarev Sea. *Journal of Experimental Biology*, 211, 3850-3858.
- Bancroft, B. A., Baker, N. J., Blaustein, A. R. (2007). Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecology Letters*, 10, 332-345.
- Bennett, A. T., Cuthill, I. C. (1994). Ultraviolet vision in birds: what is its function?. *Vision Research*, 34, 1471-1478.
- Bernhard, G. H., Bais, A. F., Aucamp, P. J., Klekociuk, A. R., Liley, J. B., McKenzie, R. L. (2023). Stratospheric ozone, UV radiation, and climate interactions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 22, 937-989.

- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology*, 452, 181-197.
- Blaustein, A. R., Belden, L. K. (2003). Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evolution and Development*, 5, 89-97.
- Blaustein, A. R., Kiesecker, J. M., Chivers, D. P., Anthony, R. G. (1997). Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13735-13737.
- Bonaventura, R., Matranga, V. (2017). Overview of the molecular defense systems used by sea urchin embryos to cope with UV radiation. *Marine Environmental Research*, 128, 25-35.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Daci, E., Segaert, S., Verstuyf, A. (1998). Vitamin D metabolism and action. *Osteoporosis International*, 8, S13.
- Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., Toder, V. (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16, 512-519.
- Carreto, J. I., Carignan, M. O. (2011). Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine Drugs*, 9, 387-446.
- Chipperfield, M. P., Hossaini, R., Montzka, S. A., Reimann, S., Sherry, D., Tegtmeier, S. (2020). Renewed and emerging concerns over the production and emission of ozone-depleting substances. *Nature Reviews Earth and Environment*, 1, 251-263.
- Clair, T. A., Sayer, B. G. (1997). Environmental variability in the reactivity of freshwater dissolved organic carbon to UV-B. *Biogeochemistry*, 36, 89-97.
- Cockell, C. S., Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews*, 74, 311-345.
- Crutzen, P. J. (1974). Estimates of possible variations in total ozone due to natural causes and human activities. *Ambio*, 3, 201-210.
- Dahms, H. U., Lee, J. S. (2010). UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology*, 97, 3-14.
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Wood, N. W. (2009). PINK1 function in health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, 1, 152-165.

- Diffey, B. L. (1991). Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology*, 36, 299.
- Diffey, B. L. (2002). What is light? *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 18, 68-74.
- Dugger, D. M., Dobkin, S. (1975). A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 29, 1-30.
- Eldeeb, M. A., Bayne, A. N., Fallahi, A., Goiran, T., MacDougall, E. J., Soumbasis, A., Zorca, C., Tabah, J. J., Thomas, R. A., Karpilovsky, N., Mathur, M., Trempe, J. F., Fon, E. A. (2024). Tom20 gates PINK1 activity and mediates its tethering of the TOM and TIM23 translocases upon mitochondrial stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121, e2313540121.
- Epel, D., Hemela, K., Shick, M., Patton, C. (1999). Development in the floating world: defenses of eggs and embryos against damage from UV radiation. *American Zoologist*, 39, 271-278.
- Fang, X., Pyle, J. A., Chipperfield, M. P., Daniel, J. S., Park, S., Prinn, R. G. (2019). Challenges for the recovery of the ozone layer. *Nature Geoscience*, 12, 592-596.
- Farman, J. C., Gardiner, B. G., Shanklin, J. D. (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO x/NO x interaction. *Nature*, 315, 207-210.
- Fingerman, M. (1965). Chromatophores. *Physiological Reviews*, 45, 296-339.
- Freere, R. H., Weibel, E. R. (1967). Stereologic techniques in microscopy. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 87, 25-34.
- Galasso, C., D'Aniello, S., Sansone, C., Ianora, A., Romano, G. (2019). Identification of cell death genes in sea urchin *Paracentrotus lividus* and their expression patterns during embryonic development. *Genome Biology and Evolution*, 11, 586-596.
- Galiano, P. G. (2011) Efecto del fototropismo en larvas y juveniles de artemia (*Artemia franciscana*, Kellogg, 1906). *Anales Universitarios de Etología*, 5, 1-14.
- Gouveia, G. R., Marques, D. S., Cruz, B. P., Geracitano, L. A., Nery, L. E., Trindade, G. S. (2005). Antioxidant Defenses and DNA Damage Induced by UV-A and UV-B Radiation in the Crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochemistry and Photobiology*, 81, 398-403.

- Habaeva, Z. G., Gagloeva, M. T., Gappoeva, V. S. (2020). The impact of the medium-wave UV radiation on the state of embryonic membrane of amphibian. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 459, 042026.
- Häder, D. P., Helbling, E. W., Williamson, C. E., Worrest, R. C. (2011). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. Photochemical & Photobiological Sciences, 10, 242-260.
- Häder, D. P., Sinha, R. P. (2005). Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 571, 221-233.
- Hail, N., Carter, B. Z., Konopleva, M., Andreeff, M. (2006). Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. Apoptosis, 11, 889-904.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. (2016). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. Cellular and Molecular Life Sciences, 73, 775-795.
- Holthuis, L. B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapod Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemonidae, 1, 1-396.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In Apoptosis and Medicine, InTechOpen.
- Hovel, K. A., Morgan, S. G. (1999). Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 237, 107-125.
- Inoue, S., Browne, G., Melino, G., Cohen, G. M. (2009). Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. Cell Death & Differentiation, 16, 1053-1061.
- Jaramillo, M. L., Ammar, D., Quispe, R. L., Guzman, F., Margis, R., Nazari, E. M., Müller, Y. M. (2017). Identification and evaluation of reference genes for expression studies by RT-qPCR during embryonic development of the emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*. Gene, 598, 97-106.
- Jaramillo, M. L., Guzman, F., Paese, C. L., Margis, R., Nazari, E. M., Ammar, D., Müller, Y. M. R. (2016). Exploring developmental gene toolkit and associated pathways in a potential new model crustacean using transcriptomic analysis. Development Genes and Evolution, 226, 325-337.

- Kashyap, D., Garg, V. K., Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 125, 73-120.
- Kerr, J. B., Fioletov, V. E. (2007). Surface ultraviolet radiation. *Atmosphere-Ocean*, 46, 159-184.
- Kim, B. M., Rhee, J. S., Lee, K. W., Kim, M. J., Shin, K. H., Lee, S. J., Lee, Y. M., Lee, J. S. (2015). UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 167, 15-23.
- Kirchhoff, V. W. J. H. (1988). Geoquímica da média e baixa atmosfera: impactos ambientais por deterioração da camada de ozônio. *Geochimica Brasiliensis*, 2, 41-52.
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., Yuba, S., Iwai, S., Todo, T. (2000). Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes to Cells*, 5, 725-738.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547.
- Li, V. C., Kirschner, M. W. (2014). Molecular ties between the cell cycle and differentiation in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 9503-9508.
- Licht, L. E. (2003). Shedding light on ultraviolet radiation and amphibian embryos. *BioScience*, 53, 551-561.
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y., Ren, J. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31, 3359-3361.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Ljubic, A., Thulesen, E. T., Jacobsen, C., Jakobsen, J. (2021). UVB exposure stimulates production of vitamin D3 in selected microalgae. *Algal Research*, 59, 102472.

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A. Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M., (2014). *Biologia Celular e Molecular* (7th ed.), Grupo A.
- Losey, G. S., Cronin, T. W., Goldsmith, T. H., Hyde, D., Marshall, N. J., McFarland, W. N. (1999). The UV visual world of fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, 54, 921-943.
- Lundsgaard, N. U., Cramp, R. L., Franklin, C. E. (2020). Effects of ultraviolet-B radiation on physiology, immune function and survival is dependent on temperature: implications for amphibian declines. *Conservation Physiology*, 8, coaa002.
- Mackie, R. M. (2000). Effects of ultraviolet radiation on human health. *Radiation Protection Dosimetry*, 91, 15-18.
- Mäder, J. A., Staehelin, J., Peter, T., Brunner, D., Rieder, H. E., Stahel, W. A. (2010). Evidence for the effectiveness of the Montreal Protocol to protect the ozone layer. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10, 12161-12171.
- Maruszczak, K. K., Jung, M., Rasool, S., Trempe, J. F., Rapaport, D. (2022). The role of the individual TOM subunits in the association of PINK1 with depolarized mitochondria. *Journal of Molecular Medicine*, 100, 747-762.
- Masui, Y., Wang, P. (1998). Cell cycle transition in early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Biology of the Cell*, 90, 537-548.
- Matsuda, S., Kitagishi, Y., Kobayashi, M. (2013). Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 601587.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- Middleton, E. M., Teramura, A. H. (1994). Understanding photosynthesis, pigment and growth responses induced by UV-B and UV-A irradiances. *Photochemistry and Photobiology*, 60, 38-45.
- Mishra, P., Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 634-646.
- Molina, M. J., Rowland, F. S. (1974). Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, 249, 810-812.
- Molina-Carrillo, L., Bassaglia, Y., Schires, G., Bonnaud-Ponticelli, L. (2023). Does the egg capsule protect against chronic UV-B radiation? A study based on encapsulated and decapsulated embryos of cuttlefish *Sepia officinalis*. *Royal Society Open Science*, 10, 230602.

- Morriss-Kay, G. M., Sokolova, N. (1996). Embryonic development and pattern formation. *The FASEB Journal*, 10, 961-968.
- Müller, Y. M. R., de Melo, M. S., Weiss, V. M. C., de Quadros, T., Ammar, D., Nazari, E. M. (2020). Ultraviolet B radiation affects epithelial cell morphology and ultrastructure in the hepatopancreas of the freshwater decapod *Macrobrachium olfersii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111096.
- Müller, Y. M. R., Nazari, E. M., Ammar, D., Cargnin Ferreira, E., Beltrame, I. T., Pacheco, C. (1999). Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16, 629-636.
- Müller, Y. M. R., Nazari, E. M., Simões-Costa, M. S. (2003). Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23, 869-875.
- Müller, Y., Ammar, D., Nazari, E. (2004). Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21, 27-32.
- Nazari, E. M., Ammar, D., Bem, A. F., Latini, A., Müller, Y. M. R., Allodi, S. (2010). Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquatic Toxicology*, 98, 25-33.
- Nazari, E. M., Ammar, D., Müller, Y. M. R., Allodi, S. (2013). Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. *Exploring Themes on Aquatic Toxicology*. Kerala, Research Signpost, 1, 103-118.
- Nazari, E. M., Simões-Costa, M. S., Müller, Y. M. R., Ammar, D., Dias, M. (2003). Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuna* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23, 862-868.
- Neale, R. E., Lucas, R. M., Byrne, S. N., Hollestein, L., Rhodes, L. E., Yazar, S., Young, A. R., Berwick, M., Ireland, R. A., Olsen, C. M. (2023). The effects of exposure to solar radiation on human health. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 22, 1011-1047.
- Neville, J. J., Palmieri, T., Young, A. R. (2021). Physical determinants of vitamin D photosynthesis: a review. *Journal of Bone and Mineral Research Plus*, 5, e10460.

- Núñez-Pons, L., Avila, C., Romano, G., Verde, C., Giordano, D. (2018). UV-protective compounds in marine organisms from the Southern Ocean. *Marine Drugs*, 16, 336.
- Obermüller, B., Karsten, U. L. F., Abele, D. (2005). Response of oxidative stress parameters and sunscreens compounds in Arctic amphipods during experimental exposure to maximal natural UVB radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323, 100-117.
- Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, 40, e104705.
- Overmans, S., Agusti, S. (2023). Differential susceptibility of Red Sea Pocilloporidae corals to UVB highlights photoacclimation potential. *Frontiers in Marine Science*, 10, 847559.
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature Cell Biology*, 20, 1013-1022.
- Pasparakis, C., Wang, Y., Stieglitz, J. D., Benetti, D. D., Grosell, M. (2019). Embryonic buoyancy control as a mechanism of ultraviolet radiation avoidance. *Science of the Total Environment*, 651, 3070-3078.
- Penacchio, O., Cuthill, I. C., Lovell, P. G., Ruxton, G. D., Harris, J. M. (2015). Orientation to the sun by animals and its interaction with crypsis. *Functional Ecology*, 29, 1165-1177.
- Perkins, H. C. (1972). Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne Edwards). *Fisheries Bulletin*, 70, 95-99.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 16–21.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.
- Plickert, G., Kroiher, M., Munck, A. (1988). Cell proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata*. *Development*, 103, 795-803.

- Polefka, T. G., Meyer, T. A., Agin, P. P., Bianchini, R. J. (2011). Effects of solar radiation on the skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 11, 134-143.
- Polo, S. E., Almouzni, G. (2005). Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Letters*, 220, 1-9.
- Powell, A. D., Dattani, N. S., Spada, R. F., Machado, F. B., Lischka, H., Dawes, R. (2017). Investigation of the ozone formation reaction pathway: Comparisons of full configuration interaction quantum Monte Carlo and fixed-node diffusion Monte Carlo with contracted and uncontracted MRCI. *The Journal of Chemical Physics*, 147.
- Prakash, S. (2021). Impact of climate change on aquatic ecosystem and its biodiversity: An overview. *International Journal of Biological Innovations*, 3, 1-6.
- Protocol, M. (1987). Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer. Washington, DC: US Government Printing Office, 26, 128-136.
- Quadros, T. D., Schramm, H., Zeni, E. C., Simioni, C., Allodi, S., Müller, Y. M. R., Ammar, D., Nazari, E. M. (2016). Developmental effects of exposure to ultraviolet B radiation on the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi*: mitochondria as a target of environmental UVB radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 279-287.
- Rossi, N., Mantelatto, F. L. (2013). Molecular analysis of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae) supports the existence of a single species throughout its distribution. *PLoS One*, 8, e54698.
- Rowland, F. S. (1991). Stratospheric ozone depletion. *Annual Review of Physical Chemistry*, 42, 731-768.
- Ruelas, D. S., Karentz, D., Sullivan, J. T. (2006). Lethal and sub-lethal effects of UVB on juvenile *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 192-200.
- Russo, R., Bonaventura, R., Matranga, V. (2014). Time-and dose-dependent gene expression in sea urchin embryos exposed to UVB. *Marine Environmental Research*, 93, 85-92.
- Sadler, T. W. (2021). *Langman Embriologia Médica* (14th ed.), Grupo GEN.
- Salo, H. M., Aaltonen, T. M., Markkula, S. E., Jokinen, E. I. (1998). Ultraviolet B irradiation modulates the immune system of fish (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae). I. Phagocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 67, 433-437.

- Schramm, H., Jaramillo, M. L., de Quadros, T., Zeni, E. C., Mueller, Y. M., Ammar, D., Nazari, E. M. (2017). Effect of UVB radiation exposure in the expression of genes and proteins related to apoptosis in freshwater prawn embryos. *Aquatic Toxicology*, 191, 25-33.
- Seirafi, M., Kozlov, G., Gehring, K. (2015). Parkin structure and function. *The FEBS Journal*, 282, 2076-2088.
- Shick, J. M., Lesser, M. P., Jokiel, P. L. (1996). Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology*, 2, 527-545.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmet, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539.
- Simões-Costa, M. S., Pacheco, C., Nazari, E. M., Müller, Y. M., Ammar, D. (2005). Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22, 501-508.
- Sary, A., Robert, C., Sarasin, A. (1997). Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutation Research/DNA Repair*, 383, 1-8.
- Strücker, G. K., Jaramillo, M. L., de Quadros, T., Nazari, E. M. (2024). UVB radiation exposure modulates mitophagy in embryonic cells of freshwater prawns *Macrobrachium olfersii*: Exploring a protective organelle quality control mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 111664.
- Tedetti, M., Sempéré, R. (2006). Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. A review. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 389-397.
- Tiwari, S., Agrawal, M., Tiwari, S., Agrawal, M. (2018). Tropospheric ozone budget: formation, depletion and climate change. *Tropospheric Ozone and its Impacts on Crop Plants: A Threat to Future Global Food Security*, 31-64.
- Tolkovsky, A. M. (2009). Mitophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793 1508-1515.
- Twomey, C., McCarthy, J. V. (2005). Pathways of apoptosis and importance in development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 345-359.

- Velders, G. J., Andersen, S. O., Daniel, J. S., Fahey, D. W., McFarland, M. (2007). The importance of the Montreal Protocol in protecting climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 4814-4819.
- Vergneau-Grosset, C., Péron, F. (2020). Effect of ultraviolet radiation on vertebrate animals: update from ethological and medical perspectives. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19, 752-762.
- Voss, A. K., Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9.
- Wang, M., Zhao, W., Wei, J., Wang, S., Xie, X. (2019). Acute effects of UVB radiation on the survival, growth, development, and reproduction of *Daphniopsis tibetana* Sars (Crustacea: Cladocera). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 10916-10925.
- Wang, Y., Han, Z., Xu, Z., Zhang, J. (2021). Protective effect of optic atrophy 1 on cardiomyocyte oxidative stress: roles of mitophagy, mitochondrial fission, and MAPK/ERK signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 3726885.
- Weatherhead, E. C., Andersen, S. B. (2006). The search for signs of recovery of the ozone layer. *Nature*, 441, 39-45.
- Wiegand, M. D., Young, D. L. W., Gajda, B. M., Thuen, D. J. M., Rittberg, D. A. H., Huebner, J. D., Loadman, N. L. (2004). Ultraviolet light-induced impairment of goldfish embryo development and evidence for photorepair mechanisms. *Journal of Fish Biology*, 64, 1242-1256.
- Williamson, C. E., De Lange, H. J., Leech, D. M. (2007). Do zooplankton contribute to an ultraviolet clear-water phase in lakes?. *Limnology and Oceanography*, 52, 662-667.
- Williamson, C. E., Neale, P. J., Hylander, S., Rose, K. C., Figueroa, F. L., Robinson, S. A., Häder, D. P., Wängberg, S. A., Worrest, R. C. (2019). The interactive effects of stratospheric ozone depletion, UV radiation, and climate change on aquatic ecosystems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18, 717-746.
- Williamson, C. E., Zagarese, H. E., Schulze, P. C., Hargreaves, B. R., Seva, J. (1994). The impact of short-term exposure to UV-B radiation on zooplankton communities in north temperate lakes. *Journal of Plankton Research*, 16, 205-218.
- Williamson, C. E., Zepp, R. G., Lucas, R. M., Madronich, S., Austin, A. T., Ballaré, C. L., Norval, M., Sulzberger, B., Bais, A. F., McKenzie, R. L., Robinson, S. A., Häder,

- D. P., Paul, N. D., Bornman, J. F. (2014). Solar ultraviolet radiation in a changing climate. *Nature Climate Change*, 4, 434-441.
- Wu, C. C., Bratton, S. B. (2013). Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19, 546-558.
- Yildirim, R. M., Seli, E. (2024). The role of mitochondrial dynamics in oocyte and early embryo development. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, 159, 52-61.
- Youle, R. J., Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 9-14.
- Yu, J., Yang, G., Tian, J. (2009). Effects of UV-B radiation on ingestion, fecundity, population dynamics and antioxidant enzyme activities of *Schmackeria inopinus* (Copepoda Calanoida). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 381, 74-81.
- Zagarese, H. E., Williamson, C. E. (2001). The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries. *Fish and Fisheries*, 2, 250-260.
- Zeni, E. C., Ammar, D., Leal, M. L., da Silva, H. S., Allodi, S., Müller, Y. M. R., Nazari, E. M. (2015). Light-mediated DNA repair prevents UVB-induced cell cycle arrest in embryos of the crustacean *Macrobrachium olfersi*. *Photochemistry and Photobiology*, 91, 869-878.
- Zhang, H., Zhu, B., Yu, L., Wang, F. (2022). Shelter Color Selection of Juvenile Swimming Crabs (*Portunus trituberculatus*). *Fishes*, 7, 296.
- Zhang, Y., Liu, M., Qin, B., Feng, S. (2009). Photochemical degradation of chromophoric-dissolved organic matter exposed to simulated UV-B and natural solar radiation. *Hydrobiologia*, 627, 159-168.
- Zhao, J., Yao, K., Yu, H., Zhang, L., Xu, Y., Chen, L., Sun, Z., Zhu, Y., Zhang, C., Qian, Y., Ji, S., Pan, H., Zhang, M., Chen, J., Correia, C., Weiskittel, T., Lin, D-W., Zhao, Y., Chandrasekaran, S., Fu, X., Zhang, D., Fan, H-Y., Xie, W., Li, H., Hu, Z., Zhang, J. (2021). Metabolic remodelling during early mouse embryo development. *Nature Metabolism*, 3, 1372-1384.
- Zhu, M., Zernicka-Goetz, M. (2020). Principles of self-organization of the mammalian embryo. *Cell*, 183, 1467-1478.