

Thaline de Quadros

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E MOLECULAR
DAS CÉLULAS DE EMBRIÕES DE CAMARÃO DE
ÁGUA DOCE EXPOSTAS À RADIAÇÃO
ULTRAVIOLETA B**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – PGBCD, do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

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

Florianópolis

2015

Quadros, Thaline de

Análise ultraestrutural e molecular das células de embriões de camarão de água doce expostas à radiação ultravioleta B / Thaline de Quadros ; orientadora, Evelise Maria Nazari - Florianópolis, SC, 2015.

xx+53 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Radiação UVB. 3. Embriotocixidade. 4. Ultraestrutura. 5. Dano mitocondrial. I. Maria Nazari, Evelise. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Aos meus pais, Jorge e Elisabete,
E a minha irmã, Thiana
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A cada sonho realizado, o primeiro sentimento que invade meu coração é a gratidão. Há uma luz que guia minha vida, e um amor que abençoa minhas escolhas, me trazendo confiança na qual nenhum obstáculo é grande demais quando temos Deus no coração.

Se hoje estou prestes a concluir mais uma etapa da minha vida, é por que encontrei profissionais maravilhosos para me dar os melhores exemplos na minha caminhada. Portanto, gostaria de começar agradecendo a minha orientadora da graduação, Prof^a Dr^a Márcia Regina Paes de Oliveira, que pela sua dedicação, me ensinou a dar os primeiros passos, me despertando o amor pela ciência e a carreira acadêmica, meu eterno carinho e gratidão.

E o passo para a pós-graduação começou com apenas um e-mail e um voto de confiança. E foi deste modo que tive o prazer de conhecer uma mulher admirável, a qual fui muito abençoada por tê-la como orientadora de mestrado, Prof^a Dr^a Evelise Maria Nazari. Meu muito obrigado por toda sua dedicação, atenção e ensinamentos, pelas vezes que me transmitiu todo seu conhecimento da forma mais doce possível, pelo fato de me apresentar as dificuldades encontradas na pesquisa, mas os melhores caminhos a percorrer com confiança e profissionalismo. Agradecer, principalmente, por acreditar na minha capacidade, e me dar à oportunidade e a honra de fazer parte da melhor equipe de laboratório, e mostrar minha dedicação e trabalho.

Á todos meus amigos do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, por todo companheirismo, ajuda e colaboração com a realização deste trabalho. Agradeço de coração por cada conversa, conselhos e risadas, por todos os momentos especiais que passamos juntos. Todos, de alguma forma, me cativaram e conquistaram os meus melhores sentimentos.

Á Prof^a Dr^a Yara Maria Rauh Müller, pela oportunidade de realizar o estágio de docência juntamente a uma profissional que levarei como exemplo por toda vida. Obrigada pela bela experiência que vivi.

Á Dr^a Carmen Simioni, que com toda sua paciência, dedicação e carinho, transmitiu seus conhecimentos para a realização do trabalho, se tornando uma amiga maravilhosa, a qual levarei no meu coração sempre.

Áos técnicos dos LAMEB's e LCME, pelo atendimento e colaboração para a realização das análises necessárias.

E por fim, nada disso seria possível se não fosse o apoio e amor incondicional da minha família. Minha eterna gratidão ao meu pai, Jorge, minha mãe, Elisabete e minha irmã, Thiana. O grande afeto, amor e carinho que nos une é indescritível, e todo esforço, sacrifícios e lágrimas por estar longe de vocês, valem a pena ao ver os seus olhos cheios de orgulho. Meu eterno e verdadeiro amor por vocês!

Todo meu carinho ao meu companheiro, Rodrigo Ficinski, que com seu apoio e incentivo, hoje estou realizando o primeiro, de muitos sonhos, com a sua ajuda e ao seu lado.

Ao Projeto Ciências do Mar/CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro.

A minha profunda e sincera gratidão a todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

“Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
E ser feliz!”
(Almir Sater)

RESUMO

O aumento da radiação ultravioleta (UVB) na superfície terrestre é resultado da diminuição do ozônio estratosférico. A energia desta radiação é capaz de causar diferentes respostas nos organismos terrestres e aquáticos. *Macrobrachium olfersi* é um camarão de água doce que vive e se reproduz em águas claras e rasas, onde a radiação UVB pode penetrar facilmente. As fêmeas de *M. olfersi* carregam seus ovos até a eclosão em uma câmara incubadora externa, podendo-se supor que os embriões estão expostos às condições semelhantes de radiação UVB do ambiente, durante todos os estágios embrionários. O objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos da radiação UVB sobre a ultraestrutura, viabilidade celular e dinâmica mitocondrial nas células embrionárias de *M. olfersi*. A irradiância de 310 mW/cm² que os embriões estão expostos nos ambientes naturais foi simulada em laboratório. Embriões no 6º dia embrionário (E6), que corresponde às fases de morfogênese e organogênese iniciais, foram irradiados com lâmpada UVB 6W, durante 30 minutos. Após 1, 12, 24 e 48 horas de exposição, os embriões foram analisados. Embriões não irradiados foram usados como controle. A análise ultraestrutural mostrou mudanças no núcleo, como a condensação da heterocromatina próxima ao envelope nuclear, bem como mudanças citoplasmáticas, como a diminuição dos ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso, formação anômala de membranas, perda das cristas mitocondriais. As alterações mitocondriais foram os efeitos da radiação UVB mais evidentes. Então, a expressão das proteínas Mfn-1 e Drp-1, relacionadas à fusão e fissão mitocondrial, respectivamente, foram quantificadas. Nossos resultados mostraram que a radiação UVB induziu aumento significativo de Drp-1 em todos os tempos analisados e também diminuição significativa de Mfn-1, apenas após 24 e 48 horas de exposição à UVB. Estes resultados indicam que a radiação UVB compromete a dinâmica mitocondrial em células de *M. olfersi*. Analisando as mudanças observadas nas mitocôndrias, o próximo passo foi investigar a viabilidade celular utilizando um teste baseado na integridade mitocondrial. Uma diminuição significativa da viabilidade celular, em todos os tempos analisados após a radiação de UVB, foi verificada. Em resumo, este estudo revelou diferentes efeitos induzidos pela radiação UVB em embriões de *M. olfersi*, principalmente relacionados com a estrutura e função mitocondrial.

Palavras-chave: UVB; embriotocidade; ultraestrutura; dinâmica mitocondrial; viabilidade celular; *Macrobrachium olfersi*.

ABSTRACT

Increased ultraviolet B (UVB) in the Earth's surface is a result of the depletion of stratospheric ozone. The energy of this radiation is able to cause different responses in terrestrial and aquatic organisms. *Macrobrachium olfersi* is a freshwater prawn that lives and reproduces in clear shallow waters, where UVB radiation can easily penetrate. The females of *M. olfersi* carry eggs until hatching in external brood pouch, thus is reasonable to assume that the embryos are exposed to similar conditions of environmental UVB radiation during all embryonic stages. The aim of this study was to characterize the effects of UVB radiation on the ultrastructure, cell viability and mitochondrial dynamic in embryonic cells of *M. olfersi*. Then, the irradiance of UVB (310 mW/cm^2) that embryos received in natural environment was simulated in laboratory. Embryos at 6th embryonic day (E6), which corresponds to the early morphogenesis and organogenesis stages, were irradiated with UVB 6W lamp for 30 minutes. After 1, 12, 24 and 48 hours of exposure to UVB radiation, the embryos were examined. Non-irradiated embryos were used as controls. The ultrastructural analysis showed changes in nucleus, as heterochromatin condensation near to the nuclear envelope, as well as, changes in the cytoplasm, as decrease of ribosomes associated to rough endoplasmic reticulum, formation of anomalous membrane, loss of mitochondrial crests, and disruption of mitochondrial membranes. Mitochondrial alterations were the most evident effect of UVB. Thus, the expression of Mfn-1 and Drp-1 proteins, related to mitochondrial fusion and fission, respectively, was quantified. Our results showed that UVB radiation induced a significant increase in Drp-1 in all times analyzed and also a significant decrease in Mfn-1, only after 24 and 48 hours of UVB exposure. These results indicate that UVB radiation compromise the mitochondrial dynamic on embryonic cells of *M. olfersi*. Regarding the changes observed in the mitochondria, the next step was to investigate the cell viability using an assay based on mitochondrial integrity. A significant decrease in viability of cells, in all times analyzed after UVB irradiation, was verified. In summary, this study revealed different effects induced by UVB radiation in embryos of *M. olfersi*, mainly related to the mitochondrial structure and function.

Keywords: UVB; embryotoxicity; ultrastructure; mitochondrial dynamics; cell viability; *Macrobrachium olfersi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de estágios de desenvolvimento embrionário do <i>M. olfersi</i>	6
Figura 2: Representação esquemática das características morfológicas externas observadas em embriões de <i>M. olfersi</i>	12
Figura 3: Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento utilizados para verificar o efeito da radiação UVB em embriões de <i>M. olfersi</i>	13
Figura 4: Secções semifinas de embriões de <i>M. olfersi</i>	19
Figura 5: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões de <i>M. olfersi</i> não irradiados.....	20
Figura 6: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões analisados após 1 hora de exposição à radiação UVB.....	21
Figura 7: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões analisados após 12 horas de exposição à radiação.....	22
Figura 8: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões analisados após 24 horas de exposição à radiação UVB.....	23
Figura 9: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões analisados após 48 horas de exposição à radiação UVB.....	24
Figura 10: Análise da ocorrência de células apoptóticas pelo método de TUNEL em embriões de <i>M. olfersi</i>	26
Figura 11: Viabilidade das células de embriões de <i>M. olfersi</i> após a exposição à radiação UVB.....	27
Figura 12: Efeito da radiação UVB sobre o conteúdo total da proteína Drp-1 em células de embriões de <i>M. olfersi</i>	30
Figura 13: Efeito da radiação UVB sobre o conteúdo total da proteína Mfn-1 em células de embriões de <i>M. olfersi</i>	31

Figura 14: Imunolocalização das proteínas Drp-1 e Mfn-1 em células de embriões de *M. olfersi*.....32

Figura 15: Síntese dos efeitos da radiação UVB em embriões de *M. olfersi*.....33

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Análise comparativa das alterações ultraestruturais observadas em embriões de *M. olfersi* expostos à radiação UVB.....25

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Viabilidade celular dos embriões de *M. olfersi* após a exposição à radiação UVB.....28

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ab:** Área blastoporal
an: Antênula
An: Apêndices Naupliares
Ap: Apêndices Pós-naupliares
At: Antenas
B: Blastômeros
BrFC: Bromofluorocarbonos
BSA: Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*
CFC: Clorofluorocarbono
DAB: 3,3'-diaminobenzidina
Dg: Disco germinativo
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
Drp-1: Proteína 1 relacionada à dinamina
e: Eucromatina
E: Dia embrionário
EGTA: Ácido tetracético glicol etileno, do inglês *ethylene glycon tetraacetetic acid*
ERO: Espécie reativa de oxigênio
Es: Estomodeu
FSC-A: Definição para o parâmetro tamanho, do inglês *forward catter*
h: Heterocromatina
Lo: Lobo óptico
Mfn-1: Mitofusina 1
Mfn-2: Mitofusina 2
MTT: Brometo de 3-(4,5)-dimetilialzolib-2,5 difeniltetrazólio
n: Núcleo
m: Mitocôndria
mc: Membranas concêntricas
mn: Mandíbula
o: Olho
O: Átomo de oxigênio livre
O₂: Molécula de oxigênio
O₃: Molécula de ozônio
Opa1: Proteína 1 de atrofia óptica
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PEM-FA: Fixador piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico, ácido tetracético glicol etileno, sulfato de magnésio, formaldeído
PIPES: Piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico

r: Ribossomos

rr: Retículo endoplasmático rugoso

SFB: Soro fetal bovino

SSC-A: definição para o parâmetro complexidade, do inglês *side scatter*

TBS: Solução Salina Tamponada com Tris

TBS-T: Solução Salina Tamponada com Tris e Tween

Te: Telson

TUNEL: Terminal transferase dUTP nick end labelinf, do inglês *transferase terminal*

dUTP nick end labelind

UV: Ultravioleta

UVA: Ultravioleta A

UVB: Ultravioleta B

UVC: Ultravioleta C

V: Vitelo

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Radiação ultravioleta.....	201
1.2 Radiação UV em ambientes aquáticos.....	2
1.3 Efeito da radiação UV sobre as células animais.....	4
1.4 Espécie de estudo: <i>Macrobrachium olfersi</i>	5
2. Objetivos.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. Materiais e métodos.....	11
3.1 Coleta dos animais.....	11
3.2 Estagiamento dos ovos.....	11
3.3 Procedimentos de irradiação.....	12
3.4 Fixação e inclusão dos ovos.....	13
3.5 Marcações celulares por imuno-histoquímica.....	14
3.6 Marcação de células apoptóticas pelo método de TUNEL.....	14
3.7 Análises celulares por citometria de fluxo.....	15
3.8 Ensaio de viabilidade celular.....	15
3.9 Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	16
3.10 Análise estatística.....	17
4. Resultados.....	19
4.1 Análises estruturais e ultraestruturais.....	19
4.2 Efeito da radiação UVB sobre a morte celular.....	25
4.3 Efeito da radiação UVB sobre a viabilidade celular.....	26
4.4 Efeito da radiação UVB sobre a dinâmica mitocondrial.....	28
5. Discussão.....	35
6. Conclusão.....	41
7. Referências bibliográficas.....	43
8. Anexo.....	53

1. Introdução

1.1. Radiação ultravioleta

O espectro solar é composto pelos raios gama, raios X, radiação ultravioleta (UV), luz visível, infravermelho, micro-ondas e o rádio, que apresentam comprimento de onda distintos e diferentes capacidade de atingir os ambientes terrestres (Diffey, 1991).

A radiação UV apresenta comprimento de onda entre 400 e 100 nm, e tem a capacidade de atingir a superfície terrestre e promover efeitos biológicos, que se tornam mais nocivos quanto menor o comprimento de onda e, conseqüentemente, maior a quantidade de energia intrínseca da radiação. Assim, a radiação UV é classificada de acordo com seus efeitos biológicos em: radiação ultravioleta A (UVA I, 400 – 340 nm; UVA II, 340 – 315 nm), radiação ultravioleta B (UVB 315 – 280 nm) e radiação ultravioleta C (UVC 280 – 100 nm) (Diffey, 2002).

Dentre os efeitos da radiação UVA e UVB, destacam-se os de importância biológica em diferentes processos naturais. A radiação UVA fornece energia luminosa para a fotossíntese e atua na ativação da enzima fotoliase, envolvida em mecanismos de fotorreparo celular (Paul e Gwynn-Jones, 2003; Dong et al., 2007; Häder et al., 2007); já a radiação UVB é necessária para a síntese de vitamina D em humanos e para a orientação visual de espécies de vertebrados e invertebrados. Por ser mais energética, a radiação UVC é caracterizada pelo seu efeito esterelizante (Land e Nilsson, 2002; Bandeira et al., 2006; Godar et al., 2012; Diffey, 2013).

A incidência de radiação UV na superfície terrestre é controlada pela camada de ozônio estratosférico, formada pelas moléculas de ozônio (O_3), que por sua vez são constituídas por um átomo livre de oxigênio (O) e uma molécula de oxigênio (O_2) (Diffey, 1991; 2002; Rowland, 2006). Nesta camada ocorre uma dinâmica constante de dissociação e formação do ozônio, que é dependente da energia da radiação UV para a quebra ou restabelecimento das ligações químicas entre o O e O_2 . Assim, considerando a faixa de comprimento de onda da radiação UV, a radiação UVA possui menor energia, e é capaz de atravessar a camada de ozônio atingindo a superfície terrestre, enquanto que parte da energia da radiação UVB que não é utilizada nas reações fotoquímicas de dissociação e formação do ozônio, atravessa a camada

de ozônio e atinge cerca de 5% na superfície terrestre, dependendo da região geográfica e da condição da camada de ozônio (Kirchhof et al., 2000; Vernet, 2006). Por ser mais energética, a radiação UVC é praticamente toda absorvida na camada de ozônio, pois sua energia é consumida nas reações de formação e dissociação do ozônio.

Contudo, a camada de ozônio vem apresentando alterações na sua composição devido às causas naturais e antrópicas, que resultam no aumento da intensidade de radiação UV na superfície terrestre (Maione et al., 2013). Esta problemática foi levantada inicialmente na década de 1970 pelos químicos Mario Molina e Frank Rowland e pelo meteorologista Paul Crutzen, que demonstraram a influência dos compostos clorofluorocarbonos (CFCs) e bromofluorocarbonos (BrFCs) na redução da camada de ozônio. A radiação UV é capaz de dissociar estes compostos na estratosfera, liberando molécula de bromo, flúor e cloro, que podem se ligar ao O e O₂, provenientes de reações fotoquímicas do ozônio, originando novas moléculas, em detrimento da molécula de O₃ (Crutzen, 1974; Molina e Rowland, 1974).

Além dessas alterações na camada de ozônio, na década de 1980 foi descoberta a existência do chamado buraco de ozônio antártico, caracterizado pela significativa redução da camada de ozônio (Farman et al., 1985). Este fenômeno ocorre devido a algumas regiões do planeta apresentarem maiores concentrações de compostos químicos, os quais participam de reações que tornam a camada de ozônio rarefeita, podendo estender-se para latitude mais baixas, desta maneira, atingindo a região Sul do Brasil (Kirchhoff et al., 2000).

As alterações na camada de ozônio têm provocado um maior e contínuo aumento, principalmente da radiação UVB na superfície terrestre. A preocupação com os efeitos causados pela radiação UVB estimulou o desenvolvimento de pesquisas na década de 1980, enfocando principalmente a saúde humana. Primeiramente, a realização de estudos com linhagens celulares de queratinócitos, componente principal da camada superficial da pele, auxiliaram na compreensão das principais alterações causadas pela radiação UVB, sobre os diferentes mecanismos celulares, como diferenciação, proliferação e morte celular (Paz et al., 2007; Ji et al., 2015). Tais estudos têm demonstrado que, dependendo da dose recebida, a radiação UVB pode ser considerada um estressor natural que desencadeia reações adversas, como queimaduras de pele (eritema), envelhecimento precoce, catarata e câncer de pele (Cadet et al., 2005; Gallagher e Lee, 2006; Bertagnolli et al., 2007; Mahmoud et al., 2008; Behrendt et al., 2010; Nasser, 2010).

1.2. Radiação UV em ambientes aquáticos

A incidência da radiação UV em ambientes aquáticos pode variar de acordo com as propriedades da coluna d'água, como profundidade e transparência. Por sua vez, a transparência da água é dependente, entre outros, dos materiais em suspensão e floração de fitoplâncton (Bancroft et al., 2007; Lee, 2010).

No final da década de 1990, os estudos foram ampliados para outros grupos animais, destacando os organismos aquáticos, como anfíbios (Hays et al., 1996; Pandelova et al., 2006; Yu et al., 2015), ouriço do mar (Pruski et al., 2009; Campanale et al., 2011; Russo et al., 2013), peixes (Dahms e Lee, 2010; Nuñez et al., 2012), e microcrustáceos (Connelly et al., 2009; Huebner et al., 2009; 2013). Mais recentemente, outros grupos animais como os macrocrustáceos (Gouveia et al., 2005; Miguel et al., 2007; Moresino et al., 2011; Vargas et al., 2011; Nazari et al., 2013) e os moluscos gastrópodes (Svanfeldt et al., 2014) também tem sido estudados, ampliando a diversidade de organismos como modelo para estudar os efeitos da radiação UVB.

Na literatura são reportados os efeitos da radiação UVB em animais adultos, juvenis, larvas e embriões de espécies de vertebrados e invertebrados, sendo demonstrados efeitos relacionados à mortalidade, e as alterações morfológicas e fisiológicas (Blaustein et al., 1994; Gouveia et al., 2004; Bonaventura et al., 2005; Herkovits et al., 2006).

É de conhecimento geral que as espécies apresentam respostas diferenciadas à radiação UVB e que os embriões apresentam maior suscetibilidade à radiação, quando comparados aos adultos, e poucos são os trabalhos que abordam especificamente os efeitos da radiação UVB sobre as células embrionárias (Bancroft et al., 2007; Nazari et al., 2010; Campanale et al., 2011).

Muitos organismos aquáticos amenizam os efeitos da radiação UVB por possuírem cascas ou conchas. Porém, os ovos e as larvas normalmente não disponibilizam destes mecanismos de defesa, ficando assim expostos à radiação, já que muitas espécies depositam seus ovos em regiões de águas rasas e claras, onde a radiação pode penetrar com a mesma intensidade que chega à superfície (Bancroft et al., 2007). Especificamente nos estágios iniciais do ciclo de vida, a radiação UVB pode comprometer o ritmo do desenvolvimento embrionário, diminuir as taxas de eclosão e de sobrevivência larval (Dong et al., 2007; Dahms e Lee, 2010; Nazari et al., 2013).

Embora os efeitos da radiação UVB sejam bastante estudados, poucos são os trabalhos onde o enfoque são os efeitos causados em

embriões, em particular com espécies de invertebrados aquáticos. Os trabalhos disponíveis abordam principalmente os efeitos da radiação na sobrevivência dos embriões, nos ritmos de desenvolvimento embrionário e durante a metamorfose larval (Hovel e Morgan, 1999; Cywinska et al., 2000; Browman et al., 2003; Nahon et al., 2009).

Dentre os invertebrados aquáticos, os trabalhos com ouriços do mar demonstraram que a radiação UVB foi capaz de induzir o surgimento de alterações morfológicas e fisiológicas em embriões e larvas (Campanale et al., 2011), bem como alterar de forma tempo e dose dependente, a expressão de genes durante as fases iniciais de desenvolvimento dos embriões (Russo et al., 2014). Em *Daphia magna*, a exposição à radiação UVB reduziu o crescimento e a reprodução, alterando órgãos como ovário e tecido intestinal (Huebner et al., 2013). Já em caranguejos *Neohelice granulata*, vários parâmetros oxidativos como produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica, foram alterados pela radiação UVB (Vargas et al., 2011). Em estudos realizados com larvas de microcrustáceos, a radiação UVB reduziu a mobilidade e interferiu diretamente no tamanho dos indivíduos, tornando-os menores e, em alguns casos, apresentaram uma elevada taxa de mortalidade (Moresino et al., 2011).

1.3. Efeito da radiação UV sobre as células animais

Os efeitos da radiação UV estão relacionados com o comprimento de onda da radiação e a dose recebida pelos organismos expostos. Estudos relatam que os efeitos nocivos da radiação UVB, cujo principal alvo celular é o DNA. Isto por que a faixa de comprimento de onda dessa radiação coincide com a absorbância máxima da molécula de DNA (Petit-Frere et al., 2000; Gilchrest, 2013). Desse modo, a energia absorvida pode acarretar lesões no DNA, levando à quebra das cadeias da molécula, formando dímeros de pirimidinas, que se constituem de ligações entre bases pirimidínicas na mesma fita de DNA. A formação desses dímeros pode comprometer os mecanismos de transcrição gênica, alterando a expressão de genes em resposta ao estresse, bem como bloquear a replicação semiconservativa, podendo por sua vez, acarretar a morte celular (Essen et al., 2006).

Estudos mostram que após a exposição à radiação UVB, os núcleos celulares apresentam perda da integridade da membrana nuclear, bem como a presença de fragmentos e/ou condensação da cromatina, causando dano ao DNA, com a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano e da formação de 6-4 fotoprodutos, causando apoptose ou

necrose destas células. (Miguel et al., 2002, Groff et al., 2010; Yang, 2011). No citoplasma, ao entrar em contato com moléculas intermediárias, como a água, a radiação UVB é capaz de formar espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem promover a peroxidação lipídica, sendo responsável por alterações na permeabilidade das membranas celulares, além de acarretar danos às moléculas celulares (Gouveia et al., 2005).

Dentre as organelas comprometidas pela radiação UVB, estão as mitocôndrias. Eventos como alongamento e ramificações, bem como a ruptura das membranas internas e externas, além de um aumento reversível no seu tamanho são mudanças relatadas em mitocôndrias irradiadas (Häder, 2005). Além desses efeitos, foi constatado que a radiação UVB é capaz de diminuir a quantidade de números de cópias de DNA mitocondrial em embriões (Martinez et al., 2012).

A mitocôndria é uma organela altamente dinâmica, que constantemente modifica sua forma e localização dentro das células. Esta dinâmica está relacionada a dois processos, fissão e fusão mitocondrial, os quais irão determinar a morfologia mitocondrial, dependendo das demandas energéticas celulares (Benard e Karbowski, 2009).

Alterações na dinâmica e na integridade mitocondrial estão por sua vez relacionadas com a indução à apoptose (Youle et al., 2012). Durante o desenvolvimento embrionário, a apoptose é um evento celular essencial para os processos de morfogênese e organogênese (Schleich e Lavrik, 2013). Diferentes estressores, como agentes quimioterápicos e radiação UV, podem desencadear a apoptose através de diferentes vias celulares de sinalização. Na última década, tem-se relacionado à dinâmica mitocondrial com a apoptose, uma vez que altos níveis de estresse celular, também podem levar à fissão e fusão excessiva das mitocôndrias (Steller, 2013).

1.4. Modelo de estudo: embriões de *Macrobrachium olfersi*

O modelo experimental utilizado neste trabalho é o embrião do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*. Esta espécie é a mais representativa do seu gênero, sendo encontrada na Ilha de Santa Catarina, nas margens rasas da Lagoa do Peri (Müller et al., 1999; Ammar et al., 2001). Os camarões de água doce são organismos fundamentais para a manutenção dos ambientes onde vivem, pois são detritívoros e participam da cadeia alimentar de peixes e aves aquáticas, atuando assim na ciclagem de energia nos ambientes (Müller et al.,

1999). Além destas características, os camarões de água doce podem ser considerados adequados como modelo animal experimental, pois as fêmeas ovígeras transportam seus numerosos ovos em uma câmara incubadora externa durante todo o período de desenvolvimento, o que permite um acompanhamento sistemático dos embriões em diferentes estágios do desenvolvimento (Charniaux-Cotton e Payen, 1992; Nazari et al., 2003; Müller et al., 2004).

O ovo de *M. olfersi* é do tipo centrolécito, com grande quantidade de vitelo, o que determina o modelo de desenvolvimento parcial superficial. Neste modelo de desenvolvimento, o embrião desenvolve-se na superfície do ovo, o que permite a sua visualização direta (Müller et al., 2004). O desenvolvimento embrionário de *M. olfersi* tem duração média de 14 dias, a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Inicialmente são reconhecidos na superfície do ovo, os blastômeros (dias 1 e 2) (Figura 1 a) e em seguida o disco germinativo (dia 3) (Figura 1 b), este último resultante do processo de gastrulação. Forma-se então o nauplius embrionizado (dia 4) (Figura 1 c), que apresenta no sentido ântero posterior os lobos ópticos, 3 pares de apêndices naupliares (antênulas, antenas e mandíbula) e a papila caudal. Em sequência, tem-se o pós-nauplius embrionizado (dia 5-14) (Figura 1 d-e) caracterizado primeiramente pela formação dos apêndices pós-naupliares e pelo crescimento dos lobos ópticos, dos apêndices naupliares e da papila caudal (Müller et al., 2003.; Simoes-Costa et al., 2005).

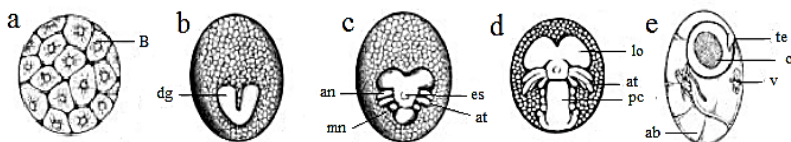


Figura 1: Representação esquemática de estágios de desenvolvimento embrionário do *M. olfersi*. Clivagem (a). Formação do disco germinativo (b). Nauplius embrionizado (c). Pós-nauplius embrionizado (d). Embrião próximo a eclosão (e). ab = abdômen; an = antênulas; at = antenas; B = blástula; dg = disco germinativo; es = estomodeu; mn = mandíbula; o = olho; pc = papila caudal; lo = lobo óptico, te = telson, v = vitelo. Fonte: Adaptado de Simões Costa, 2005.

Considerando que as fêmeas apresentam uma carapaça transparente e que os ovos na câmara incubadora externa estão expostos às condições do meio, pode-se supor que os embriões estejam expostos a condições semelhantes de radiação UVB do seu meio ambiente. Na Ilha de Santa Catarina, *M. olfersi* se reproduz principalmente nos meses de verão (Müller et al., 1999; Ammar et al., 2001), quando os índices de UV têm sido muito elevados, de acordo com a escala estabelecida pela Organização Mundial de Saúde e com os registros do Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE) (www.cptec.inpe.br).

Assim, neste trabalho foram realizadas análises a fim de verificar os efeitos da radiação UVB em células de embriões de camarão de água doce, os quais se desenvolvem em ambientes naturais de águas claras e rasas, onde a incidência da radiação UV é a mesma da superfície.

A preocupação crescente quanto aos efeitos das mudanças climáticas globais, especialmente sobre os efeitos da radiação UVB sobre os organismos, justifica-se pelos relatos que confirmam a redução progressiva da camada de ozônio em altas e médias latitudes (United Nations Environment Programme (UNEP), 2014)

Considerando que as espécies apresentam sensibilidade diferenciada à radiação UV, faz-se necessário ampliar o número de espécies aquáticas investigadas, uma vez que os estudos são realizados principalmente com equinodermas, peixes e anfíbios. Acrescenta-se ainda o fato destes estudos serem realizados com larvas, juvenis e adultos. Desta forma, pouco se conhece a respeito dos efeitos da radiação UVB sobre os mecanismos celulares inerentes ao desenvolvimento embrionário.

Dados obtidos pelo grupo do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/UFSC apontam para alterações nos embriões de *M. olfersi* induzidas pela radiação UVB (Nazari et al., 2010; 2013). Contudo, investigamos os efeitos desta radiação, e respondemos as seguintes perguntas, dentre elas: (i) a viabilidade celular pode ser alterada após a exposição destes embriões a radiação UVB? (ii) a radiação UVB é capaz de alterar a ultraestrutura das células embrionárias? (iii) que organelas celulares podem ser danificadas pela exposição à radiação? (iv) pode a mitocôndria ser um alvo da radiação UVB nas células de embriões de *M. olfersi*?

Sendo assim, considerando os conhecimentos atuais sobre os efeitos da radiação UVB nas células de um modo geral, a hipótese formulada neste projeto foi a de que a exposição à radiação UVB é

capaz de causar a perda da viabilidade celular, promovida por alterações estruturais e funcionais nas mitocôndrias, promovendo a morte celular por apoptose nas células de embriões de camarão *M. olfersi*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a ultraestrutura, viabilidade celular e dinâmica mitocondrial nas células de embriões de camarões de água doce *M. olfersi* expostos à radiação UVB.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar as alterações ultraestruturais relacionadas às membranas celulares, mitocondriais e núcleo de embriões expostos à radiação UVB;
- Analisar a viabilidade celular dos embriões, após a exposição à radiação UVB;
- Reconhecer o efeito da radiação UVB sobre a ocorrência de apoptose e expressão de proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial.

3. Materiais e métodos

3.1. Coleta dos animais

Exemplares adultos de camarões de água doce de *M. olfersi* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, Brasil e transportados em aquários portáteis para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - Centro de Ciências Biológicas (CCB - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)). Em laboratório, os camarões foram colocados em aquários de 60 litros com aeração constante, temperatura de 24°C (± 1) e em condições de fotoperíodo de 12 horas claro:12 horas escuro, sendo o período claro criado com lâmpada fluorescente com irradiação de luz visível de 96 mW/cm² (Philips TLT 40 W/ 75 RS). Nas primeiras 24 horas após a coleta, foi realizado monitoramento frequente para a verificação das condições gerais e eventual mortalidade dos camarões em ambiente artificial. Após, os camarões foram diariamente alimentados com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish). Para a obtenção de fêmeas ovígeras em laboratório, os camarões foram redistribuídos na proporção de 1 macho:3 fêmeas. Os procedimentos de coleta e manutenção dos camarões em laboratório de pesquisa, adotados neste trabalho, foram aprovados pelo IBAMA (Autorização Permanente nº 15294-1/2008).

3.2. Estagiamento dos ovos

Amostras de ovos ($n \cong 20$ ovos) de fêmeas ovígeras obtidas em aquário foram utilizadas para a definição do estágio do desenvolvimento embrionário, através do reconhecimento das características morfológicas externas dos embriões analisados ao estereomicroscópio (Olympus SHZ, 70X). Neste trabalho foi adotado o estagiamento por dia embrionário (E), que corresponde a cada intervalo de 24 horas de desenvolvimento, de acordo com o proposto por Simões-Costa et al., (2005). Para a composição dos grupos experimentais, foram selecionadas fêmeas ovígeras com embriões no 6º, 7º e 8º dias embrionários (E6, E7 e E8), que correspondem aos embriões em processo iniciais de morfogênese e organogênese (Müller et al., 2003). Para a caracterização dos embriões em E6, E7 e E8 foram reconhecidas externamente: a formação e o desenvolvimento dos lobos ópticos, da

papila caudal, dos apêndices naupliares e pós-naupliares (antênlulas, antenas e mandíbulas) e o surgimento do olho (Figura 2).

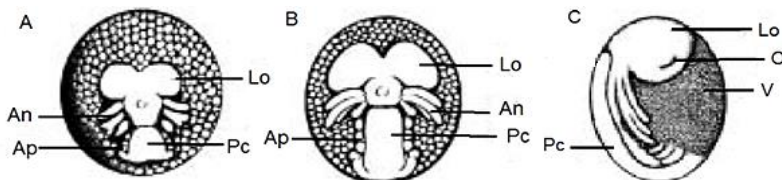


Figura 2. Representação esquemática das características morfológicas externas observadas em embriões de *M. olfersi*. Em A e B pode-se observar em vista dorsal embriões no estágio de pós-nauplius inicial, em E6 e E7, respectivamente. Em C, observa-se em vista lateral o embrião em E8, que corresponde ao estágio de pós-nauplius intermediário. An, apêndices naupliares; Ap, apêndices pós-naupliares; Lo, lobo óptico; Pc, papila caudal; O, olho; V, vitelo. Fonte: modificado de Simões-Costa et al., (2005).

3.3. Procedimentos de irradiação

Para caracterizar temporalmente a ação da radiação UVB sobre os embriões de *M. olfersi*, fêmeas ovígeras com ovos em E6 foram transferidas para aquário de 30 litros desprovido de abrigos, equipado com lâmpada UVB de 6 W de potência (Vilber Lourmat) e irradiadas por 30 minutos. O período de 30 minutos de exposição à radiação UVB foi baseado no trabalho de Nazari et al. (2010), onde a incidência da radiação no fundo do aquário foi medida com radiômetro Internacional Light IL1400A, sendo obtida a irradiância de 310 mW.cm^{-2} , que simulou a irradiância natural média na qual as fêmeas de *M. olfersi* são expostas durante a estação reprodutiva na Ilha de Santa Catarina. Decorrido o período de irradiação, os embriões foram analisados em 4 intervalos de tempo: após 1, 12, 24 e 48 horas (Figura 3). Para o grupo controle, foram utilizados ovos de fêmeas não irradiadas nos estágios de desenvolvimento em E6 (correspondente aos estágios dos embriões irradiados após 1 hora e 12 horas), E7 (correspondente aos estágios dos embriões irradiados após 24 horas) e E8 (correspondente aos estágios dos embriões irradiados após 48 horas).

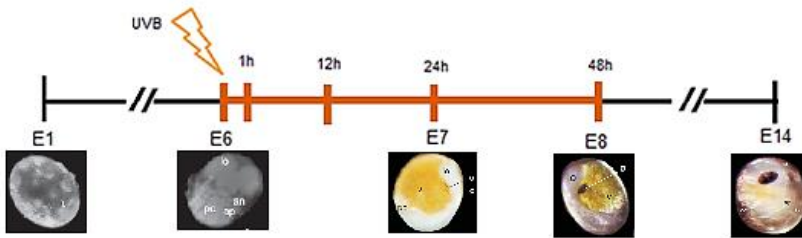


Figura 3: Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento utilizados para verificar o efeito da radiação UVB em embriões de *M. olfersi*. A região colorida da linha do tempo corresponde ao período em horas nas quais foram realizadas as análises dos embriões após a exposição à radiação UVB. // corresponde a mudança na escala temporal do desenvolvimento embrionário.

3.4. Fixação e inclusão dos ovos

Para as análises em microscopia de luz, os ovos foram fixados em solução PEM-FA (tampão PIPES 0,1 M + EGTA 2,0 mM + $MgSO_4$ 1,0 mM + formaldeído a 3,7%) pH 6,9 (adaptado de Scholtz et al., 1994) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, os ovos foram mantidos em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*, composto por 500 mM de cloreto de sódio (NaCl) + 3 mM de cloreto de potássio (KCl) + 1 mM de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 12 mM de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4)/L) pH 7,4 a 4°C. Em seguida, os ovos foram submetidos a banhos em solução crioprotetora de sacarose a 5% e 15% por 3 horas a 4°C e em solução de sacarose a 30% por 24 horas a 4°C. A inclusão dos ovos foi realizada com meio comercial Tissue Tek® a -25°C e as secções seriadas na espessura de 6 μ m foram obtidas em micrótomo criostato Leica CM 1850 UV (Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia/CCB – LAMEB II). As secções foram montadas em lâminas tratadas com poli-L-lisina, contendo secções dos grupos controles e irradiados, proporcionando as mesmas condições durante a realização das técnicas. Após a montagem, as lâminas foram mantidas a 4°C para a preservação das secções. As lâminas foram destinadas para as análises de marcação celular por imuno-histoquímica e de pelo método de TUNEL.

3.5. Marcações celulares por imuno-histoquímica

As lâminas foram lavadas em banhos de água corrente por 3 vezes à temperatura ambiente para a remoção do meio de montagem. Em seguida, as secções foram tratadas com peróxido de hidrogênio: metanol 100% (1:2) por 10 minutos para a inativação das peroxidases endógenas. A permeabilização das membranas celulares foi realizada com banho PBS 0,1 M, pH 7,4 + TritonX-100 a 0,3% por 30 minutos e em seguida, as secções foram imersas em soro fetal bovino (SFB) a 5% por 45 minutos para a inativação dos sítios inespecíficos. As secções foram incubadas com anticorpos primários (anti-Mfn-1 na diluição de 1:100 e anti-Drp-1 na diluição de 1:100, Santa Cruz Biotechnology) em câmara úmida a 4°C, permanecendo por 12 horas. Após, as secções foram lavadas com PBS + TritonX-100 a 0,3% e em seguida incubadas com anticorpos secundários anti-coelho biotilado conjugado à peroxidase na diluição de 1:200 (Sigma) durante 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram lavadas com PBS TritonX-100 a 0,1%. 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.

3.6. Marcação de células apoptóticas pelo método de TUNEL

Para esta análise, foram utilizados os reagentes do Kit TdT FragEL DNA Fragmentation Detection kit (Calbiochem). As secções foram submetidas a 3 banhos em água corrente para a remoção do meio de montagem Tissue Tek. Em seguida, as secções foram lavadas com tampão Tris-salino (TBS, do inglês *Tris buffered saline*) 0,1 M, pH 7,4. As secções foram permeabilizadas com proteinase K diluída em tampão Tris 10 mM, pH 8,0 (1:500), lavadas com TBS 20 mM e em seguida, lavadas com metanol: peróxido de hidrogênio (2:1) para o bloqueio das peroxidases endógenas. Na sequência, as secções foram preparadas para a incubação com a enzima de marcação do TUNEL a 37°C, tratadas com DAB, contracoradas com verde de metila, sendo as lâminas montadas com Entellan. Para os controles negativos, foram seguidos os mesmos

procedimentos, suprimindo-se a adição da enzima de marcação do TUNEL.

3.7. Análises celulares por citometria de fluxo

Os ovos foram fixados em solução de paraformaldeído a 1% por 18 horas a 4°C. Após a fixação, os ovos foram lavados por 3 vezes durante 5 minutos em tampão PBS 10 mM, pH 7,8, sem adição de cálcio e magnésio (NaCl + KCl + Na₂HPO₄ + KH₂PO₄ + H₂O destilada). Os ovos foram triturados com homogeneizador de tecidos (*Tissue Tearor*) com PBS + Tween-20, por aproximadamente 30 segundos, sendo as células dissociadas com tripsina a 0,25% por 15 minutos à temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas com SFB a 10% por 45 minutos para o bloqueio dos sítios inespecíficos e centrifugadas a 640X g por 2 vezes de 10 minutos cada à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento e a fração superior foram desprezados, utilizando-se somente a fração intermediária com as células em suspensão. Amostras de células foram separadas em alíquotas de 350 µL contendo aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células. Em seguida, as amostras foram separadas em três lotes: (1) Branco, amostra pura, (2) Iodeto de Propídio, para verificar a integridade celular e (3) Marcações celulares. As amostras destinadas às marcações celulares foram incubadas com os anticorpos primários (anti-Mfn1, na diluição de 1:250; anti-Drp1, na diluição de 1:200; Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora, seguido da incubação com anticorpo secundário anti-coelho Alexa 568, na diluição de 1:2000 (Invitrogen) por 45 minutos à 4°C ao abrigo de luz. Após, para as análises foi utilizado citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia/CCB – LAMEB I). Previamente, foi realizado um ensaio com células não coradas para determinar a população de interesse. Assim, a partir do diagrama de pontos com 10.000 eventos e considerando a dispersão *side scatter* (SSC-A) e *forward scatter* (FSC-A) foram determinados 3.500 eventos. As análises de citometria de fluxo foram feitas pelo programa Flowing Software versão 2.5, sendo realizadas separadamente para cada anticorpo em cada tratamento.

3.8. Ensaio de viabilidade celular

Para analisar a viabilidade celular dos embriões após a exposição à radiação UVB foi realizado o ensaio de MTT (brometo de

3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com a metodologia proposta por Mosman (1983). Amostras de 60 mg de ovos de cada grupo experimental foram trituradas mecanicamente com PBS pH 7,6 e posteriormente centrifugadas a 640X g por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento e a fração superior foram desprezados, utilizando-se somente a fração intermediária contendo as células em suspensão. Foram plaqueados 50 µL desta solução, em triplicatas, em microplacas de 96 poços. Após o plaqueamento, foram adicionados aos poços 40 µL de MTT na concentração de 0,5 mg/mL. A placa foi incubada a 37°C e após 30 minutos, adicionou-se 100 µL de DMSO (dimetil sulfóxido). Em células viáveis, as desidrogenases mitocondriais e citosólicas são capazes de agir sobre substratos, como o MTT, levando a sua redução, formando cristais púrpuras de formazan. Os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO e a cor formada foi quantificada através de espectrofotômetro a 550 nm. Para o cálculo da viabilidade celular, foi considerada a viabilidade de 100%, a absorbância média obtida para os embriões do grupo controle. A viabilidade celular percentual dos embriões irradiados foi calculada a partir da viabilidade 100% obtida no grupo controle.

3.9. Análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para o reconhecimento de alterações ultraestruturais desencadeadas pela radiação UVB, os ovos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5%, diluídos em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M durante 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o córion (envoltório dos ovos) foi permeabilizado utilizando hipoclorito de cálcio a 5% durante 20 minutos, sob agitação constante, seguido da adição da solução de tiosulfato de sódio por 2 minutos, a fim de neutralizar a reação anterior. Após permeabilizar o córion, os ovos retornaram para a solução fixadora por mais 24 horas. Em seguida, foram pós-fixados por 5 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1% + tampão cacodilato de sódio a 0,1 M. Os ovos foram desidratados em séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) durante 40 minutos cada, e a infiltração foi realizada com resina Spurr (Spurr, 1969) nas proporções acetona:resina de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e resina pura por 24 horas cada. Foram obtidas secções semifinas (500 nm - 1 µm) e ultrafinas (60 - 70 nm). As secções semifinas foram coradas com solução de azul de toluidina a 1% e observadas ao

microscópio de luz para controle da orientação dos embriões e observação da qualidade do tecido. As secções ultrafinas foram coletadas em grades *mesh*, contrastadas com acetato de uranila a 5% por 40 minutos e citrato de chumbo a 1% de por 10 minutos (Reynolds, 1963). As análises foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM 1011) (Laboratório Central de Microscopia/UFSC – LCME).

3.10. Análise estatística

Os resultados quantitativos referentes às marcações celulares, bem como da análise de viabilidade celular foram avaliados no programa estatístico Statistica versão 10.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey, com a significância de $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análises ultraestruturais

Inicialmente, a partir de secções semifinas nos planos sagital e coronal, foram localizadas as regiões a serem analisadas ultraestruturalmente por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4).

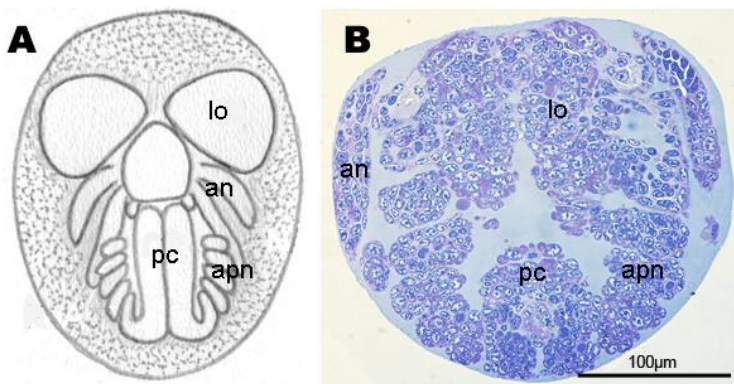


Figura 4: Secções semifinas de embriões de *M. olfersi*. Esquema da vista coronal do embrião (A). Embrião controle em corte coronal (B). an = apêndices naupliares; apn = apêndices pós-naupliares; lo = lobo óptico; pc = papila caudal.

A partir das análises ultraestruturais realizadas nos planos sagital e coronal de secções ultrafinas de embriões não irradiados, foram reconhecidas nas células a presença de núcleo, com a cromatina distribuída de forma regular, com as regiões de eucromatina e heterocromatina bem definidas. Por sua vez, o citoplasma apresentou-se eletrondenso devido à alta quantidade de ribossomos, tanto aderidos ao retículo endoplasmático rugoso, como livre no citoplasma, indicando uma célula com elevada atividade proteica. Assim como os ribossomos, estas células apresentam grande quantidade de mitocôndrias localizadas principalmente na região próxima ao núcleo. As cristas mitocondriais mostram-se bem desenvolvidas e definidas, com a preservação das membranas internas e externas, compatível com a alta demanda

energética requerida no processo de desenvolvimento embrionário (Figura 5)

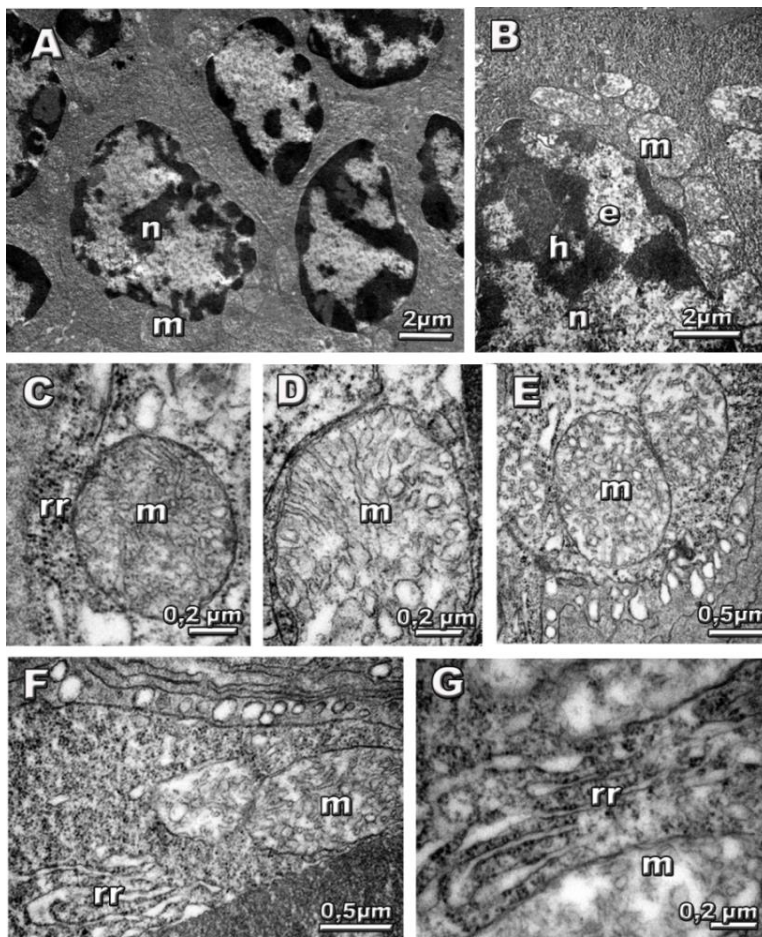


Figura 5: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões de *M. olfersi* não irradiados. Vista geral das células embrionárias mostrando a integridade do citoplasma e do núcleo (A). Detalhe do posicionamento das mitocôndrias próximas ao núcleo (B). Detalhe da morfologia mitocondrial (C-E). Detalhe da organização do retículo endoplasmático rugoso (F e G). e = eucromatina; h = heterocromatina; n = núcleo; m = mitocôndria; rr = retículo endoplasmático rugoso.

Após 1 hora da exposição à radiação UVB, o núcleo e o citoplasma mostram-se semelhantes aos dos embriões não irradiados. Porém, as mitocôndrias apresentam-se mais dispersas com o padrão morfológico alterado. As alterações mitocondriais reconhecidas foram as constrictões e as modificações nas membranas externas, bem como a redução nas dimensões das cristas mitocondriais. Outro padrão reconhecido nestas células foi à presença de mitocôndrias com formato circular, conhecidas como mitocôndria-*donut* (Figura 6).

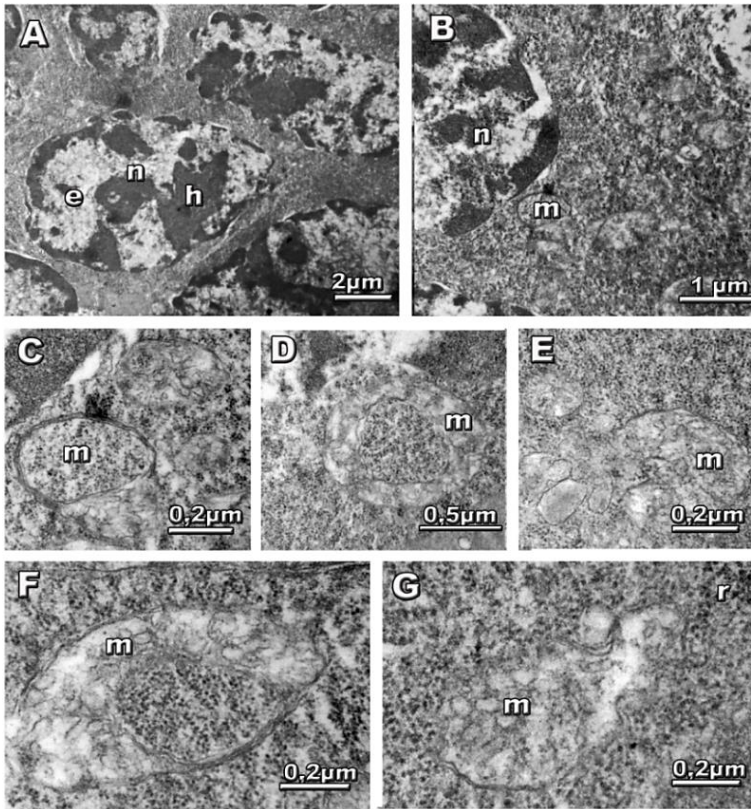


Figura 6: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões de *M. olfersi* analisados após 1 hora de exposição à radiação UVB. Vista geral das células embrionárias mostrando a integridade do citoplasma e do núcleo (A). Detalhe do posicionamento das mitocôndrias no citoplasma (B). Detalhe da morfologia mitocondrial (C-G). e = eucromatina; h = heterocromatina; n = núcleo; m = mitocôndria; r = ribossomos.

Após 12 horas da exposição à radiação UVB, as células apresentaram núcleo com a heterocromatina altamente condensada. No citoplasma é possível observar o retículo endoplasmático rugoso com uma redução na quantidade de ribossomos aderidos à sua membrana e ribossomos livres, além de mitocôndrias alteradas. As alterações mitocondriais mais evidentes foram a diminuição e ausência das cristas mitocondriais (Figura 7).

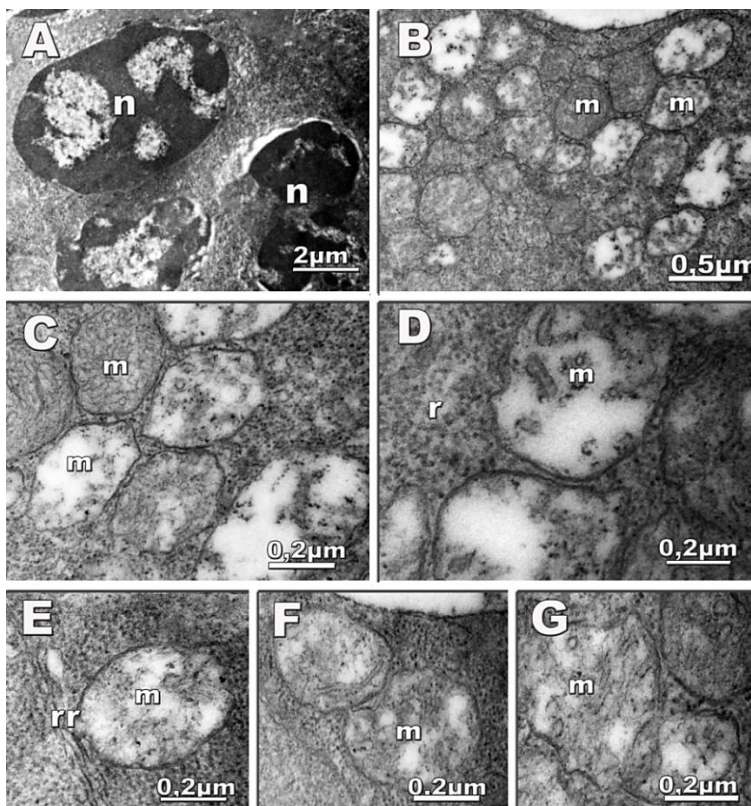


Figura 7: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões de *M. olfersi* analisados após 12 horas de exposição à radiação UVB. Vista geral das células embrionárias com a condensação da heterocromatina (A). Detalhe do posicionamento das mitocôndrias (B). Detalhe da morfologia mitocondrial (C-D, F-G). Detalhe da organização do retículo endoplasmático rugoso (E) e = eucromatina; h = heterocromatina; n = núcleo; m = mitocôndria; rr = retículo endoplasmático rugoso; r = ribossomos.

Após 24 horas da exposição à radiação UVB, as células apresentaram morfologia compatível com o perfil apoptótico. Observou-se o rompimento do envoltório nuclear, além da intensa condensação da heterocromatina. No citoplasma, notou-se a presença de mitocôndrias alteradas, principalmente a formação de mitocôndria-*donut*, diminuição das cristas mitocondriais, perda da integridade estrutural das membranas mitocondriais externas, bem como morfologia compatível ao processo de fissão mitocondrial (Figura 8).

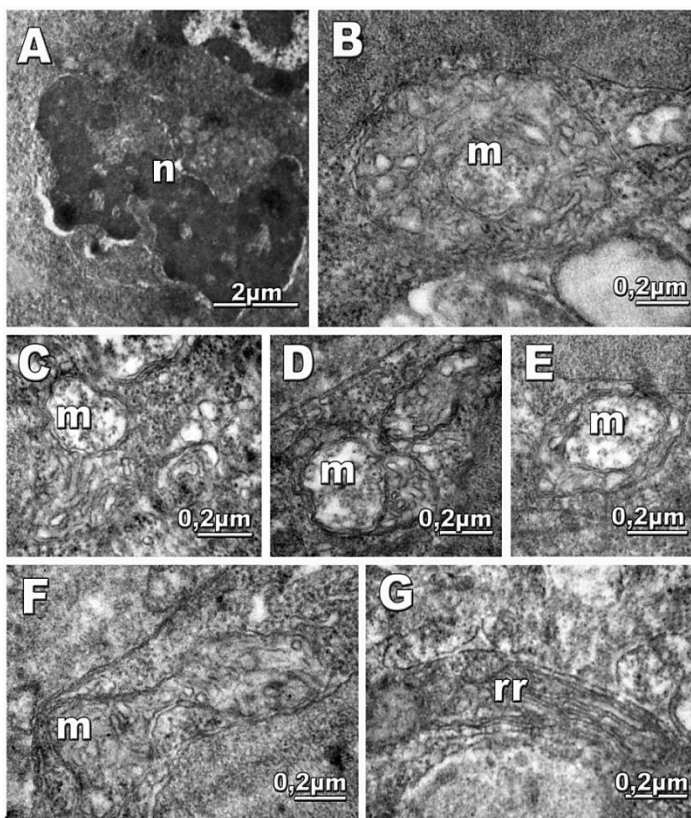


Figura 8: Análise ultraestrutural de secções ultrafinas de embriões de *M. olfersi* analisados após 24 horas de exposição à radiação UVB. Vista geral das células embrionárias apresentando perfil apoptótico (A). Detalhe da morfologia mitocondrial (B-E). Mitocôndria com perfil compatível ao processo de fissão mitocondrial (F). Detalhe da organização do retículo endoplasmático rugoso (G). n = núcleo; m = mitocôndria; rr = retículo endoplasmático rugoso.

Após 48 horas de exposição à radiação UVB, pode-se observar nas células a condensação da heterocromatina na periferia do núcleo, característico de células em apoptose. Já no citoplasma, houve uma redução na quantidade das mitocôndrias, as quais apresentaram a morfologia com cristas e membranas normais. Porém, foi possível reconhecer um aumento na quantidade de retículo endoplasmático rugoso e também a formação anômala de membranas concêntricas (Figura 9).

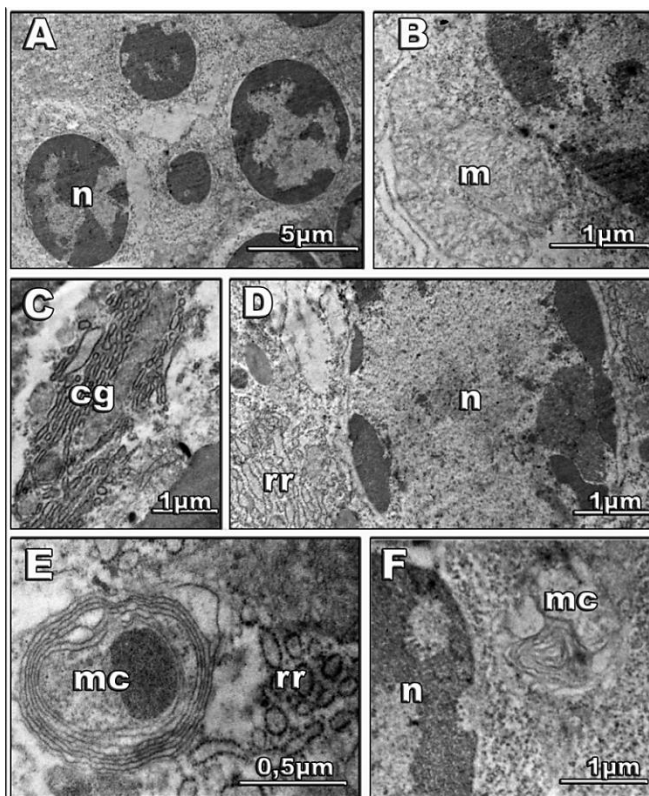


Figura 9: Análise ultraestrutural de seções ultrafinas de embriões de *M. olfersi* analisados após 48 horas de exposição à radiação UVB. Vista geral das células embrionárias compatível ao perfil apoptótico (A). Detalhe da morfologia mitocondrial (B). Detalhe da organização do retículo endoplasmático rugoso (C e D). Presença de membranas concêntricas (E e F). cg = complexo de golghi; n = núcleo; m = mitocôndria; mc = membranas concêntricas; rr = retículo endoplasmático rugoso.

As características observadas em todos os grupos analisados estão resumidamente apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Análise das alterações ultraestruturais observadas em embriões de *M. olfersi* expostos à radiação UVB.

Principais alterações		Controle	UVB			
			1 h	12 h	24 h	48 h
Mitocondriais	Redução e ausência de cristas	-	++	++	++	-
	Formato de <i>donut</i>	-	++	-	++	-
	Rompimento das membranas externas	-	+	+	++	-
Membranares	Formação de membranas concêntricas	-	no	no	no	++
Nucleares	Intensa condensação da heterocromatina	-	+	++	++	++

Símbolos indicam intensidade da presença das alterações: ausente (-), fraca (+), intensa (++); no (não observado).

4.2. Efeito da radiação UVB sobre a morte celular

Considerando que nos embriões irradiados e analisados após 24 e 48 horas, foram observadas células com perfil nuclear apoptótico, realizou-se a análise da fragmentação do DNA associada ao processo apoptótico pelo método de TUNEL.

Nos embriões irradiados foram observados núcleos com marcação positiva nos lobos ópticos, apêndices corporais e na papila caudal, não sendo observada regionalização para esta marcação (Figura 10). Embora a apoptose seja um mecanismo celular inerente ao desenvolvimento, nos embriões controles analisados não foi possível observar marcação pelo método de TUNEL.

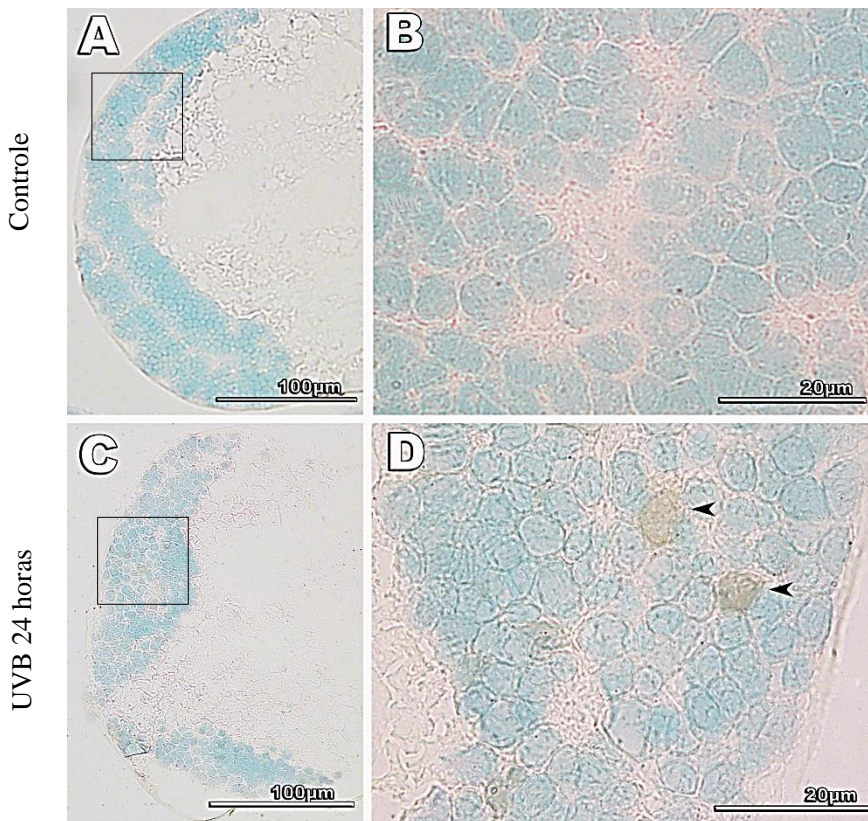


Figura 10: Análise da ocorrência de células apoptóticas pelo método de TUNEL em embriões de *M. olfersi*. Vista sagital do embrião controle (A). Detalhe das células de A (B). Vista sagital do embrião irradiado com UVB (C). Detalhe das células de C (D). Seta indica células em apoptose.

4.3. Efeito da radiação UVB sobre a viabilidade celular

Em decorrência das alterações ultraestruturais observadas, realizou-se a análise da viabilidade celular através do método MTT, e notou-se uma diminuição significativa ($p \leq 0,0001$) na viabilidade das células dos embriões de *M. olfersi* em todos os grupos irradiados, quando comparados com o seu respectivo controle, mostrando que a

radiação UVB apresenta um efeito citotóxico sobre as células de embriões de *M. olfersi* (Figura 11).

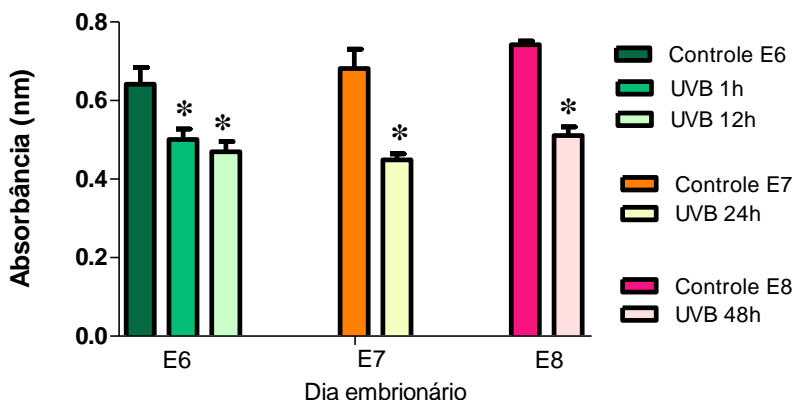


Figura 11: Viabilidade das células de embriões de *M. olfersi* após a exposição à radiação UVB. Dados representados em média (\pm erro padrão). (*) indica diferença significativa entre os embriões expostos à radiação UVB e seus respectivos controles, no mesmo dia embrionário ($p \leq 0,0001$).

A viabilidade celular observada nos grupos analisados após 1 e 12 horas da exposição à radiação UVB, foi de 78% e 73,16% respectivamente, quando comparadas com o controle E6. Já os embriões irradiados com UVB e analisados após 24 horas, a viabilidade celular foi equivalente a 65,93%, em relação ao controle E7. Nos embriões irradiados com UVB e analisados após 48 horas, foi observado 68,76% da viabilidade celular, quando comparados com o controle E8 (Tabela 1).

Tabela 1: Viabilidade celular dos embriões de *M. olfersi* após a exposição à radiação UVB.

	Grupos	Absorbância (nm) (Média ± Erro padrão)	% de viabilidade celular
E6	Controle	0,641 ± 0,014	100%
	UVB 1 hora	0,500 ± 0,008	78%*
	UVB 12 horas	0,469 ± 0,008	73,16%*
E7	Controle	0,681 ± 0,016	100%
	UVB 24 horas	0,449 ± 0,014	65,93%*
E8	Controle	0,742 ± 0,009	100%
	UVB 48 horas	0,511 ± 0,021	68,76%*

Dados indicam valores das absorbâncias médias e suas respectivas porcentagens em relação aos grupos controle. (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,0001$) entre embriões expostos à radiação UVB e seus respectivos controles.

4.4. Efeito da radiação UVB sobre a dinâmica mitocondrial

Diante das alterações morfológicas observadas nas mitocôndrias dos embriões irradiados, foi realizada a análise da expressão da proteína Drp-1, envolvida no processo de fissão mitocondrial e da proteína Mfn-1, envolvida no processo de fusão mitocondrial.

Nos embriões irradiados com UVB, a expressão da proteína Drp-1 foi significativamente maior ($p \leq 0,001$) em comparação com seus respectivos controles e considerando uma população total de 10.000 células por análise em citometria de fluxo. Nos embriões expostos à radiação UVB e analisados após 1 e 12 horas, a quantificação das células reativas para Drp-1 foi de 232 células ($\pm 22,35$) e 239 células ($\pm 43,20$), respectivamente. Já os embriões do grupo controle E6, apresentaram 93 células reativas ($\pm 34,44$) (Figura 12 A-F). Nos embriões irradiados e analisados após 24 horas, foram quantificadas 277 células reativas ($\pm 23,18$), enquanto que os embriões do controle E7 apresentaram 175 células ($\pm 17,08$) (Figura 12 G e H). Após 48 horas de exposição à radiação UVB o número de células reativas para Drp-1 foi de 510 ($\pm 39,80$), comparadas com 101 células ($\pm 13,52$) de embriões controle E8 (Figura 12 I e J). A análise da marcação celular da proteína Drp-1 por imuno-histoquímica, mostra a localização citoplasmática

desta proteína, principalmente próxima ao núcleo celular (Figura 14 A e B). Não foi observada regionalização para esta marcação, sendo observadas células imuno marcadas nas regiões embrionárias dos lobos ópticos, apêndices corporais e na papila caudal.

A quantificação da expressão da proteína Mfn-1, apresentou uma diminuição significativa ($p \leq 0,001$) somente nos embriões irradiados e analisados após 24 e 48 horas, comparados com seus respectivos controles e considerando um total de 10.000 células por análise. Nos embriões analisados após 1 e 12 horas de irradiação, a quantificação das células reativas para Mfn-1 foi de 85 células ($\pm 20,59$) e 104 células ($\pm 27,15$), respectivamente, não diferindo significativamente do grupo controle E6 (133 células reativas $\pm 47,17$) (Figura 13 A-D). Nos embriões irradiados e analisados após 24 horas, foram registradas 120 células reativas ($\pm 41,74$), comparadas com 412 células reativas ($\pm 16,25$) do grupo controle E7 (Figura 13 E e F). Após 48 horas, os embriões irradiados apresentaram 260 células reativas ($\pm 13,89$), comparadas com 420 células reativas ($\pm 14,14$) do grupo de embriões controle E8 (Figura 13 G e H). Por imuno-histoquímica, observa-se a localização citoplasmática da proteína Mfn-1, (Figura 14 C e D), sendo observadas células imuno marcadas em todas as regiões embrionárias.

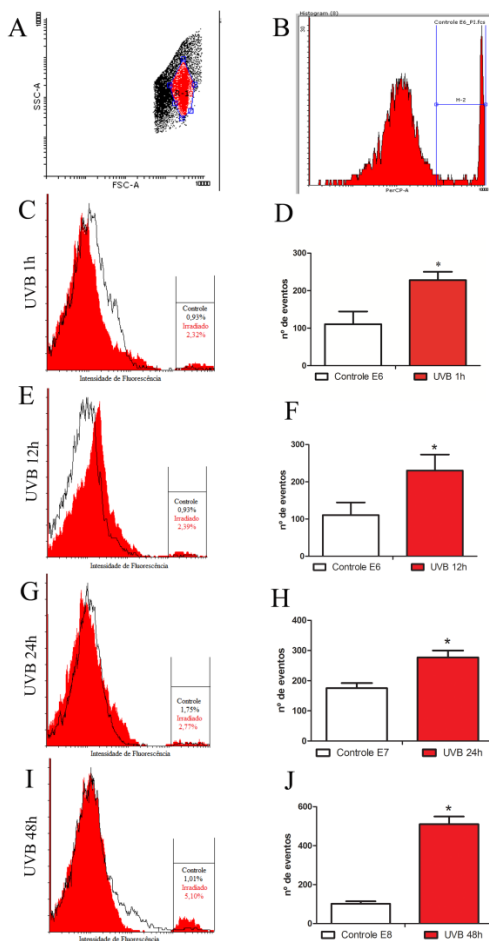
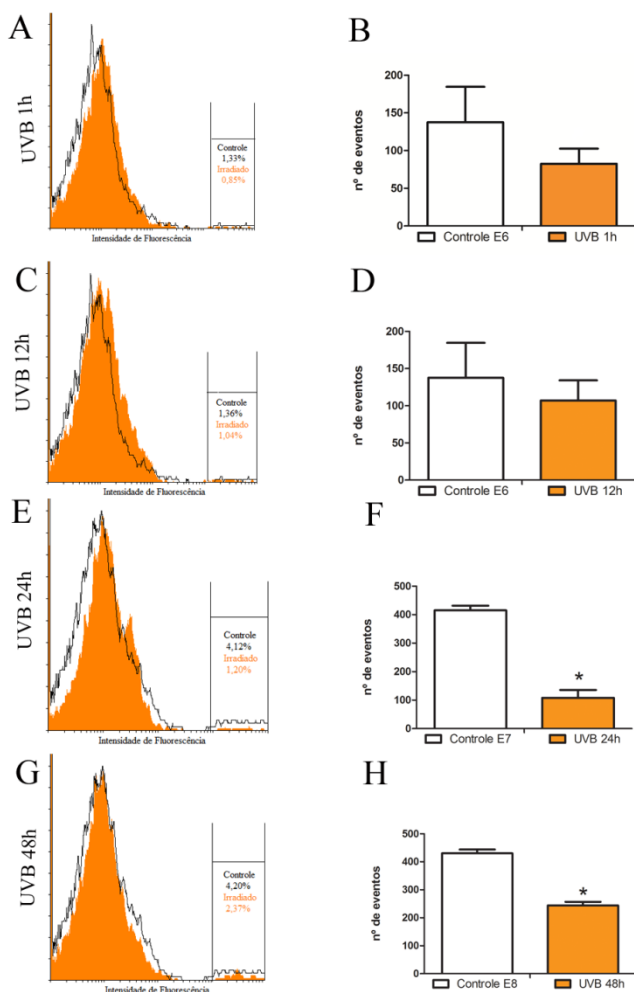


Figura 12: Efeito da radiação UVB sobre o conteúdo total da proteína Drp-1 em células de embriões de *M. olearis*. Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células embrionárias analisadas (vermelho) (A). Histograma de marcação com Iodeto de Propídeo (B) para identificar a população de células viáveis, que coincide com a população em vermelho do histograma A. Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (C, E, G e I) nos grupos de 1, 12, 24 e 48 horas após a radiação UVB, respectivamente. Gráficos de barras representando à média (\pm desvio padrão) do número absoluto de células marcadas (D, F, H e J). (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre os embriões expostos à radiação UVB e seus respectivos controles. $n \cong 4.500$ ovos/grupo, em três experimentos independentes.



Figuras 13: Efeito da radiação UVB sobre o conteúdo total da proteína Mfn-1 em células de embriões de *M. olfersi*. Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (A, C, E e G) nos grupos de 1, 12, 24 e 48 horas após a radiação UVB, respectivamente. Gráficos de barras representando à média (\pm desvio padrão) do número absoluto de células marcadas (B, D, F e H). (*) indica diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre os embriões expostos à radiação UVB e seus respectivos controles. $n \cong 4.500$ ovos/grupo, em três experimentos independentes.

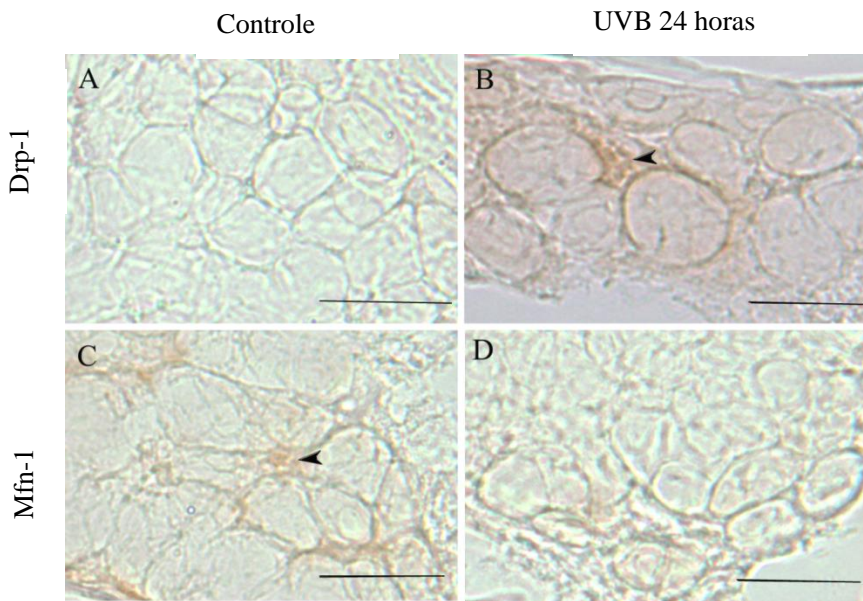


Figura 14: Imunolocalização das proteínas Drp-1 e Mfn-1 em células de embriões de *M. olfersi*. Células de embrião controle e após a exposição à radiação UVB marcadas com anticorpo anti-Drp-1 (seta) (A e B). Células de embriões controle e após a exposição a radiação UVB marcadas com o anti-Mfn-1 (seta) (C e D). Barras de escala: 20 μ m.

Os diversos efeitos celulares decorrentes da exposição de embriões de *M. olfersi* à radiação UVB estão resumidamente abordados na Figura 15.

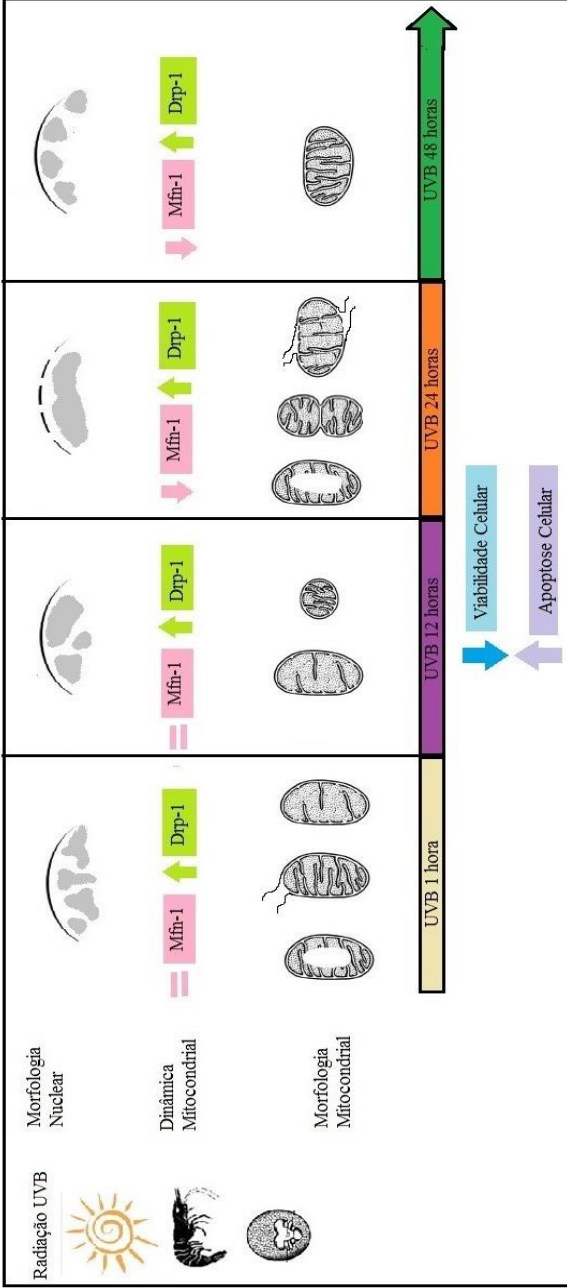


Figura 15: Síntese dos efeitos da radiação UVB em embriões de *M. olfersi*. A radiação UVB pode alterar a ultraestrutura das células embrionárias, tais como a condensação da heterocromatina e rompimento do envelope nuclear; modificação do perfil mitocondrial, como redução das cristas mitocondriais e formação de mitocôndrias-*dumet* e rompimento das membranas mitocondriais externas. A radiação UVB altera também a dinâmica mitocondrial, com o aumento da proteína Drp-1, e diminuição da proteína Mfn-1. Todos estes processos comprometem a viabilidade celular e levam ao aumento da apoptose celular.

5. Discussão

No presente trabalho, foram investigados os efeitos da radiação UVB sobre as células embrionárias do camarão de água doce *M. olfersi*. O interesse por estudar o efeito da radiação UVB sobre os organismos em geral surgiu na década de 1970 com a compreensão de que a liberação de compostos CFCs e BFCs na atmosfera, eram capazes de comprometer a formação da camada de ozônio e comprometendo sua capacidade de atenuar a incidência da radiação UVB sobre a superfície terrestre (Diffey, 1991; Shanklin, 2010).

Porém, ainda existe uma carência de estudos sobre os efeitos da radiação UVB sobre os embriões de espécies aquáticas, e mais ainda sobre embriões de crustáceos, os quais podem estar sujeitos à radiação UVB durante o seu desenvolvimento. Tal carência dificultou as comparações diretas dos resultados obtidos neste trabalho com trabalhos que enfoque os efeitos da radiação UVB em células embrionárias. Assim, buscou-se sustentar os resultados obtidos utilizando referências de embriões de outras espécies, bem como células de culturas humanas, muito empregadas para elucidar as respostas biológicas frente ao insulto da radiação UVB. Esta possibilidade de comparação é possível devido ao caráter conservativo das moléculas e mecanismos celulares nos diferentes grupos animais.

Os indivíduos adultos de crustáceos tem sido utilizados em trabalhos que enfocam os efeitos desta radiação (Miguel et al., 2002, 2007; Yu et al., 2009), porém, considerando a hipótese de que os embriões são mais suscetíveis do que as larvas e os adultos, faz-se necessário ampliar os trabalhos que abordam os efeitos da radiação UVB nos estágios iniciais do ciclo de vida.

No presente estudo, analisamos embriões no estágio embrionário de E6, o qual corresponde aos processos de morfogênese e organogênese iniciais, cujas estruturas embrionárias encontram-se ainda em formação e não estão totalmente estruturadas, sendo formadas por poucas camadas de células. Esta organização permite o melhor reconhecimento das regiões embrionárias e, portanto, o seu acompanhamento durante os estágios de desenvolvimento. Ao contrário do esperado, embriões em E6 expostos à radiação UVB, não apresentaram alterações estruturais nas regiões embrionárias típicas, como lobo óptico, apêndices corporais e papila caudal. No estudo realizado utilizando embriões de *zebra fish*, a radiação UVB foi capaz de provocar a alteração da taxa de sobrevivência, bem como diversas malformações durante o desenvolvimento embrionário (Nuñez et al., 2012).

Ao analisarmos a ultraestrutura das células embrionárias, nossos resultados mostraram, porém, importantes alterações celulares em resposta da exposição à radiação UVB. As alterações nucleares encontradas nas células de *M. olfersi* são compatíveis com o perfil morfológico observado durante o processo de apoptose em células animais (Alberts, 2002). Miguel et al. (2002) constataram alterações ultraestruturais no núcleo e citoplasma das células da retina de caranguejos adultos da espécie *Ucides cordatus* após o insulto da radiação UVB, bem como a indução da apoptose em células da lâmina ganglionar (Miguel et al., 2007).

Em relação à ultraestrutura citoplasmática, uma das alterações observadas foi a diminuição da quantidade de ribossomos aderidos às membranas no retículo endoplasmático rugoso de células embrionárias irradiadas com UVB. De acordo com a literatura, uma das respostas ao estresse celular é esta diminuição, a qual pode ocasionar a repressão da síntese proteica, diminuindo a quantidade de proteínas que devem ser processadas pelo retículo endoplasmático rugoso. Estudos de Malhotra e Kaufman (2007) e Widell et al. (2014) afirmam ainda que a radiação UVB é capaz de formar ERO, e que estes estão relacionados com o comprometimento da homeostasia do retículo endoplasmático rugoso, uma vez que ERO induz a peroxidação lipídica nas membranas do retículo endoplasmático rugoso, processo pelo qual pode interferir no enovelamento proteico, resultando em um acúmulo de proteínas mal enoveladas.

Outra alteração ultraestrutural observada como resposta a exposição à radiação UVB, foi a formação anômala de membranas concêntricas no citoplasma, conhecidas como *myelin-like*. Estudo desenvolvido por Castejón et al. (2008) tem relacionado a formação destas membranas concêntricas em resposta a insultos celulares, como a administração de drogas, grande variedade de processos patológicos, bem como insultos como o da radiação UVB (Armiliato et al., 2014).

Dentre as alterações ultraestruturais observadas nas células irradiadas, a organização do perfil mitocondrial foram as mais evidentes. As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e possuem a capacidade de assumir diferentes formas refletindo respostas celulares durante as fases do ciclo celular, ou durante o desenvolvimento embrionário, ou ainda quando expostas a condições tóxicas (Bereiter-Hahn, 1994).

No presente estudo, as mitocôndrias expostas à radiação UVB apresentaram a perda das cristas mitocondriais, bem como a ruptura das membranas mitocondriais externas. Estas características também foram

observadas em análises da ultraestrutura de células epiteliais da retina humana expostas à radiação UVB, onde houve a deformidade da organização mitocondrial e diminuição das cristas mitocondriais (Xu et al., 2010). Estas características morfológicas no perfil mitocondrial também foram observadas em células de embriões de peixes expostos à radiação UVB (Romaniuk et al., 2014). Uma vez que o número de mitocôndrias por célula e o número de cristas por mitocôndrias estão relacionados com a necessidade de energia para realizar as funções celulares. Assim, como observado em *M. olfersi*, a perda ou diminuição de mitocôndrias e/ou de suas cristas, podem ocasionar diversos danos às funções desempenhadas nas células quando expostas à radiação UVB durante o desenvolvimento embrionário. De acordo com Karbowski et al. (2003), a perda da integridade das cristas mitocondriais compromete, além do fornecimento de energia para a célula, a manutenção do citocromo c nos compartimentos mitocondriais, desencadeando assim, o processo de apoptose.

A diversificação nas formas das mitocôndrias torna esta organela altamente versátil na sua função de manter a sobrevivência das células e a homeostase do tecido, como afirma Ahmad et al. (2013). No presente estudo, observou-se nas células irradiadas a formação de mitocôndria em formato de anel, conhecidas como mitocôndria-*donut*. Nos estudos de Liu et al. (2011) e Ahmad et al. (2013) foram verificadas a formação de mitocôndria-*donut* como uma resposta comum a diferentes tipos de insultos, como hipóxia-reoxigenação e estresse oxidativo. Ainda no estudo de Liu et al. (2011), a alteração morfológica mitocondrial que culmina com a formação da mitocôndria-*donut*, está relacionada a uma diminuição da atividade de fusão mitocondrial após um estresse metabólico.

Tendo em vista os resultados obtidos referentes às alterações na morfologia mitocondrial nas células de *M. olfersi* expostas à radiação UVB, analisamos também marcadores de fusão (Mfn-1) e fissão (Drp-1) relacionados à dinâmica mitocondrial. Entende-se por dinâmica mitocondrial o equilíbrio entre os processos de fissão e fusão de mitocôndrias, os quais ocorrem em condições celulares normais. Estes processos são mediados por trifosfatases guanosinas (GTPases) altamente conservadas entre leveduras, moscas e mamíferos (Hoppins et al., 2007). A fissão mitocondrial é mediada pela dinamina citosólica chamada Drp-1, a qual é recrutada para a formação de espirais em torno das mitocôndrias, e através de contrações, são capazes de romper as membranas mitocondriais internas e externas. Este processo é essencial para o crescimento das células em desenvolvimento, uma vez que

mantem o número adequado de mitocôndrias nas células. O processo de fusão mitocondrial é mediado pela dinamina Mfn-1 ancorada à membrana mitocondrial, não sendo essencial para a sobrevivência celular, porém, é necessário para o desenvolvimento embrionário e para a sobrevivência das células em fases posteriores ao desenvolvimento (Chen et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que após a exposição à radiação UVB, as células de *M. olfersi* responderam de forma a alterar a dinâmica mitocondrial, uma vez que os níveis de Drp-1 aumentaram significativamente. Esta observação sustenta o fato de que as células embrionárias intensificaram o processo de fusão mitocondrial como resposta ao estresse provocado pela radiação UVB. Por outro lado, houve uma diminuição significativa dos níveis de Mfn-1, o qual está relacionado com diminuição do processo de fissão mitocondrial nestas células. Estas alterações no perfil da expressão das proteínas podem estar envolvidas no balanço fissão/fusão da mitocôndria, podendo afetar a dinâmica mitocondrial, possivelmente desencadeando a morte celular por apoptose, uma vez que a manutenção da homeostase mitocondrial é essencial para a viabilidade celular.

Estudos mostram que em uma situação de estresse, o processo de fissão mitocondrial está relacionado com o controle da qualidade das mitocôndrias, atuando no processo de mitofagia, o qual elimina mitocôndrias danificadas (Egan et al., 2011). O interesse por esclarecer a relação entre a dinâmica mitocondrial e o processo de apoptose, levou a realização do estudo de Suen et al. (2008) que comprovou que as células de mamíferos são capazes de apresentar fissão excessiva das mitocôndrias em resposta a altos níveis de estresse celular. Nesse mesmo estudo de Suen et al. (2008), foi verificado que o processo de fissão mitocondrial está diretamente relacionado com a translocação de proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 e citocromo c para o citoplasma, induzindo a morte celular por apoptose. O estresse celular provocado pela radiação UVB em cultura de queratinócitos humanos induziu à disfunção da dinâmica mitocondrial, a qual progrediu nas análises temporais realizadas após a exposição, cuja alteração está relacionada diretamente com a morte celular (Paz et al., 2007).

Outras abordagens em relação à dinâmica mitocondrial referem-se ao seu papel na manutenção da função do DNA mitocondrial (mtDNA) durante o desenvolvimento normal da célula. O estudo de Bess et al. (2013), com células de *Caenorhabditis elegans* demonstra que o mtDNA aparenta ser mais suscetível aos danos causados pela exposição a contaminantes ambientais, como a radiação UVB, do que o DNA

nuclear. E ainda que as lesões induzidas ao mtDNA são lentamente removida através de um processo dependente de genes relacionados ao processo de fissão mitocondrial, incluindo o Drp-1. Uma vez que em nossos resultados, a concentração da proteína Drp-1 aumentou em células irradiadas, podemos supor que este aumento está relacionado com a tentativa de reparos causados nos mtDNA após a exposição à radiação UVB.

Uma vez que a mitocôndria apresentou diversas alterações estruturais e funcionais, foi levantada a dúvida se tais alterações pudessem comprometer a viabilidade das células embrionárias de *M. olfersi*. Assim, através de um teste baseado na integridade mitocondrial foi comprovada a perda da viabilidade celular imediatamente, 24 e 48 horas após a exposição à radiação UVB. Estudos relatam a perda da viabilidade celular juntamente com a perda da função mitocondrial em células da córnea de coelhos expostos à radiação UVB, bem como em cultura de queratinócitos, onde os resultados revelaram a perda do potencial de membrana mitocondrial associada com o aumento de células não viáveis (Mercucci et al., 2014; Piao et al., 2014).

As evidências de apoptose nas células expostas à radiação UVB, apresentadas pelas alterações ultraestruturais e na dinâmica mitocondrial, foram confirmadas pela aplicação do método de TUNEL. Nos embriões dos grupos controles, esse método também evidenciou a ocorrência de apoptose. A presença de células apoptóticas nos controles é esperada, pois o mecanismo de morte celular por apoptose é inerente para os processos de morfogênese e organogênese. Contudo, a radiação UVB foi capaz de intensificar a ocorrência deste processo, contribuindo assim para a diminuição da viabilidade celular dos embriões de *M. olfersi*. A indução à apoptose nas células após a exposição à radiação UVB certamente contribui para reduzir o número de células não-viáveis. Estudos sobre os efeitos da radiação UVB constataram que a fragmentação mitocondrial ocorreu em paralelo com a formação de corpos apoptóticos (Paz et al., 2007; Burrattini et al., 2009; Piao et al., 2014).

Classicamente, o DNA tem sido considerado o principal cromóforo da radiação UVB nas células animais (Franco et al., 2009). Contudo, tendo em vista o panorama acima descrito e considerando os conhecimentos atuais sobre os efeitos da radiação UVB, os resultados obtidos no presente trabalho suportam o fato de que a mitocôndria pode ser considerada um importante alvo celular desta radiação. Isto porque, esta organela apresentou alterações ultraestruturais e funcionais, que interferiram na dinâmica mitocondrial através do aumento e diminuição

na concentração das principais proteínas envolvidas nos processos de fissão e fusão, respectivamente. Estas alterações resultaram no comprometimento da viabilidade celular dos embriões de *M. olfersi*, o que conseqüentemente pode ter levado á indução do processo de morte celular por apoptose. Extrapolando-se para o que ocorre na natureza, pode-se sugerir que elevados índices de radiação UVB, como os registrados na Ilha de Santa Catarina nos meses de verão, nos quais os animais estão expostos durante a estação reprodutiva, podem comprometer o desenvolvimento dos embriões, e por conseqüência gerar comprometimentos maiores nas populações de *M. olfersi*.

Entendemos que o presente estudo realizado com as células embrionárias de *M. olfersi*, pode contribuir com o conhecimento atual sobre os efeitos da radiação UVB em organismos animais. Nesta perspectiva, a utilização de embriões de *M. olfersi* é uma alternativa de modelo animal, que se mostrou adequado na compreensão dos diferentes mecanismos celulares em resposta ao insulto. Os resultados aqui obtidos referentes às alterações mitocondriais abrem para novas perguntas, as quais requerem a utilização não somente de ferramentas da biologia células, mas também de ferramentas bioquímicas e moleculares para melhor elucidar os múltiplos efeitos da radiação UVB e as respostas celulares.

6. Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a radiação UVB interferiu nas células embrionárias de *M. olfersi*, causando:

- Alterações ultraestruturais, tais como a condensação da heterocromatina, alterações na estrutura de organelas como retículo endoplasmático rugoso, bem como a formação anômala de membranas concêntricas;
- Evidente alteração na ultraestrutura mitocondrial, principalmente a redução e perda das cristas mitocondriais e a desestruturação da membrana mitocondrial externa;
- Modificações na expressão das principais proteínas envolvidas nos processos de fissão e fusão mitocondriais, Drp-1 e Mfn-1, respectivamente, alterando a dinâmica mitocondrial;
- Diminuição da viabilidade celular e, desencadeando um aumento no número de células em processo de morte celular por apoptose;

Diante de todas as alterações apresentadas neste estudo, pode-se afirmar que a além do DNA, a mitocôndria pode ser considerada um importante alvo da radiação UVB.

Os embriões de *M. olfersi* mostraram-se ser um modelo adequado para o estudo dos efeitos da radiação UVB em ambientes artificiais.

7. Referências bibliográficas

Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mikherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B.K., Kumar, M., Michael, A., Agrawal, A. 2013. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death and Disease*. 4, e461.

Alberts, B. et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science Publishing. 1400p. Brown, T. A. Genomes 2.

Ammar, D., Müller, Y.R., Nazari, E. 2001. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina. *Rev. Bras. Zool.*, 18: 529-537.

Armiliato, N., Ammar, D., Nezzi, L., Stralioetto, M., Mullher, Y.M., Nazari, E.M. 2014. Chances in Ultrastructure and Expression of Steroidogenic Factor-1 in Ovaries of Zebrafish *Danio rerio* Exposed to Glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part 1: Current Issues*. 37-41.

Bancroft, B.A., Baker, N.J., Blaustein, A.R. 2007. Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecol. Lett.*, 10: 332-345.

Bandeira, F., Griz, L., Dreyer, P., Eufrazino, C., Bandeira, C., Freese, E. 2006. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 50:640-646.

Behrendt, L., Jönsson, M.E., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J. 2010. Induction on cytochrome P450 1 genes and stress response genes in developing *zebrafish* exposes to ultraviolet radiation. *Aquat. Toxicol.*, 98:74-82.

Bereiter-Hahn, J., Voth, M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27, 198-219.

Bertagnolli, C., Peres, R.S., Carbone, S., Manfro, R.L., Pinheiro, D.K., Schuch, A.A.M.P., Nozawa, H., Yamaroto, H., Schuch, N.J. 2007. Estimativa para cálculo de ozônio total usando dados de UVB e UVA do observatório espacial do sul, Brasil. *Rev. Bras. Geof.*, 25:9-15.

- Bess, A.S., Leung, M.C.K., Ryde, I.T., Meyer, J.N. 2013. Effects of mutation in mitochondrial dynamics-related genes on the mitochondrial response to ultraviolet C radiation in developing *Caenorhabditis elegans*. *Worm*. 2(1).
- Blaustein, A.R., Hoffman, P.D., Hokit, D.G., Kiesecker, J.M., Walls, S.C., Hays, J.B. 1994. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1791-1795.
- Bonaventura, R., Poma, V., Costa, C., Matranga, V. 2005. UVB radiation prevents skeleton growth and stimulates expression stress markers in sea urchin embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328: 150-157.
- Browman, H.I., St-Pierre J.F., Kuhn P. 2003. Dose and dose-rate dependency in the mortality response of *Calanus finmarchicus* embryos exposed to ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 247: 297-302.
- Cadet, J., Sage, E., Douki, T. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res. Fund. Mol.*, 571:3-17.
- Campanale, J.P., Tomanek, L., Adams, N.L. 2011. Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 397:106-120.
- Castejón, O. J., and Castejón, H. V. 2008. Electron microscopy of myelin figures in normal and pathological tissues. A review. *Acta Microsc.* 17: 13–19.
- Charniaux-Cotton, H., Payen, G.G. 1992. Arthropoda-Crustacea: sexual differentiation. In: Adyiodi, K.G., Adyiodi, R.G. (Eds.). *Reproductive biology of invertebrates*. Wiley & Sons, New York, 281-323.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., Chan, D.C. 2010. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289

Connelly, S.J., Moeller, R.E., Sanchez, G., Mitchell, D.L. 2009. Temperature effects on survival and DNA repair on four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochem Photobiol.* 85: 144-52.

Crutzen, P.J. 1974. Estimates of possible variation in total ozone due to natural causes and human activities. *Photochem Photobiol.*, 72: 652-659.

Cywinska, A., Crump, D., Lean, D. 2000. Influence of UV radiation on four freshwater invertebrates. *Photochem. Photobiol.*, 72: 652-659.

Dahms, H.U., Lee, J.S. 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat. Toxicol.*, 97: 3-14.

Diffey, B.L. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Rev. Phy. Med. Bio.*, 36: 299-328.

Diffey, B.L. 2002. What is light? *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.*, 18:68-74.

Diffey, B.L. 2013. Modelling vitamin D status due to oral intake and sun exposure in an adult British population. *Brit. J. Nutr.*, 23.

Dong, Q., Svoboda, K., Tiersch, T.R., Monroe, T.W. 2007. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: Evidence for a competent photorepair system. *J. Photochem. Photobiol.*, 88: 137-146.

Egan, D. F. 2011. The machines that divide and fuse mitochondria. *Science* 331, 456.

Essen, L. O.; Klar, T. 2006. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 63, n. 11, p. 1266-1277.

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*, v. 315, p. 207-210.

Franco R., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M., Panayiotidis M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutant. Res.*, 674: 3-22.

Gallagher, R.P., Lee, T.K. 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Prof. Biophys. Mol. Biol.*, 92:119-131.

Gilchrest, B. 2013. Photoaging *Milestone Cutaneous Biology*. June 28.

Groff, A. 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 99, n. 2, p. 93-99.

Godar, D.E., Pope, S.J., Grant, W.B., Holick, M.F. 2001. Solar UV doses of young Americans and vitamin D3 production. *Environ. Health. Persp.*, 120:139-143.

Gouveia, G.R., Lopes, T.S., Neves, C.A., Nery, L.E.M., Trindade, G.S. 2004. Ultraviolet radiation induces dose-dependent pigment dispersion in crustacean chromatophores. *Rev Pigment Cell.*, 17: 545-548.

Gouveia, G.R., Marques, D.S. Cruz, B.P., Geracitano, L.A., Nery, L.E.M., Trindade, G.S. 2005 Antioxidant Defenses and DNA Damage Induced by UV-A and UV-B Radiation in the Crab *Chasmagnatus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochem. Photobiol.*, 81:398-403.

Hays, J.B., Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M., Hoffman, P.D., Pandelova, I., Coyle, D., Richardson, T. 1996. Developmental responses of amphibians to solar and artificial UVB sources: a comparative study. *Photochem Photobiol.* 64: 449-56.

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*, v. 571, n. 1, p. 221-233.

Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interaction with climate change. *Photochem. Photobiol. Scienc.*, 6: 267-285.

- Herkovits, J., D'eramo, J.L.D., Fridman, O. 2006. The effect of UV-B radiation on *Bufo arenarum* embryos survival and superoxide dismutase activity. *Int. J. Environ. Rev. Public Health*, 3: 43-47.
- Hoppins, S., Lackner, L., Nunnari, J. 2007. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Rev. Biochem.*76, 751.
- Hovel, K.A., Morgan, S.G. 1999. Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 237: 107-125.
- Huebner, J.D., Loandman N.L., Wiegand, M.D., Youle, D.L., Warszycki, L.A. 2009. The effect oh chronic exposure to artificial UVB radiation on the survival and reproduction of *Daphnia magna* across two generations. *Photochem Pgotobiol.* 85: 374-8.
- Huebner, J.D., Loadman, N.L., Wiegand, M.D., Huebner, E., Palitsky, D.J., Husaewycz, W.H., 2013. UVB radiation affects growth, reproduction and tissue structure of *Daphnia magna* across several temperatures. *Photochem Photobiol.*, 89: 103-110.
- Ji, Y., Cai, L., Zhenf, T., Ye, H., Rong, X., Rao, J., Lu, Y. 2015. The mechanism of UVB irradiation induced-apoptosis in cataract. *Mol Cell Biochem.* 401: 87-95.
- Karbowski M, Youle, R.J. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10:870–880.
- Karbowski, M. 2009. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol* 20, 365-374.
- Kirchhoff, V.W.J.H., Echer, E., Leme, N.P., Silva, A.A. 2000. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. *Braz. J. Geophys.*, 18: 63-74.
- Land, M. F.; Nilsson, D. E. 2002. *Animal Eyes*. Oxford University Press.

Liu X, Hajnoczky G. 2001. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death Differ*; 18: 1561–1572.

Mahmouh, B.H., Hexsel, C.L., Hamzavi, I.H., Lim, H.W. 2008. Effects of visible light on the skin. *Photochem. Photobiol.*, 84:450-462.

Maione, M. 2013. Ten years of continuous observations of stratospheric ozone depleting gases at Monte Cimone (Italy) - Comments on the effectiveness of the Montreal Protocol from a regional perspective. *Science of The Total Environment*, v. 445, p. 155-164, 2013.

Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. 9 (12): 2277-93.

Mandarim-de-Lacerda, Carlos A. 2007. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n.4, p. 469-486.

Martinez, E.A., Gil, M.A., Maside, C., Cuello, C., Parrilla, I. 2012. Effects of Hoechst 33342 staining and ultravioleta irradiation on mitochondrial distribution and DNA copy number in porcine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction e Development*, 9: 651-663.

Mencucci, R., Favuzza, E., Lapucci, A., Felici, R., Resta, F., Chiaruqi, A., Cavone, L. 2014. CoQ10-containing eye drops prevent UVB-induced córnea cell damage and increase córnea wound healing by preserving mitochondrial funtion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 9;55(11): 7266-71

Miguel, N. C. O.; Meyer-Rochow, V. B.; Allodi, S. 2002 Ultrastructural study of first and second order neurons in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Micron*, v. 33, n. 7, p. 627-637.

Molina, M.J., Rowland, F.S. 1974. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature*, 249: 819-812.

Moresino, R. D. H.; Gonçalves, R. J.; Helbling, E. W. 2011. Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 407, n. 2, p. 363-369.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Müller, Y.M.R., Nazari, E.M., Ammar, D., Ferreira, E.C., Beltrame, I.T., Pacheco, C. 1999. *Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratonés, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil*. *Rev. Bras. Zool.*, 16: 629-636.

Müller, Y.M.R., Nazari, E.M., Simões-Costa, M.. 2003. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *J. Crust. Biol.*, 23: 869-875.

Müller, Y.M.R., Ammar, D., Nazari, E.M. 2004. Embryonic development of four species of Palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and pos-naupliar periods. *Rev. Bras. Zool.*, 21:27-32.

Nahon, S., Porras, V.A.C., Pruski, A.M., Charles, F. 2009. Sensitivity to UV radiation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Sci. Total Environ.*, 407: 1892-1900.

Nasser, N. 2010. UVB: suscetibilidade no melanoma malign. *Na. Bras. Dermatol.* 85:843:848.

Nazari, E. M., Simões-Costa, M., Müller, Y.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). *J. Crust. Biol.*, 23: 862-868.

Nazari, E.M., Ammar, D., Bem, A.F., Latini, A., Müller, Y.M.R., Alldi, S. 2010. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquat Toxic.* 98:25-33.

Nazari, E.M. Ammar,D., Müller, Y.A.R., Allodi, S. 2013. Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. In Exploring Themes on Aquatic Toxicology. Research Signpost. 1:103-118.

Nuñez, E.T., Sobrino, C., Neale, P.J., Ceinos, R.M. 2012. Molecular response to ultravioleta radiation exposure in Fish embryos: implication for survival and morphological development. Photochemistry and Photobiology. 88: 701-707.

Pandelova, I., Hewitt, S.R., Rollins-Smith, L.A., Hays, J.B. 2006. UVB dose-toxicity thresholds and steady-state DNA photoproducts levels during chronic irradiation of inbred *Xenopus laevis* tadpoles. Photochem Photobiol. 82 (4): 1080-7.

Paul, N.D., Gwynn-Jones, D. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: Towards an integrated approach. Trends. Ecol. Evol. 18: 48-55.

Paz, M.L., Maglio, D.H.G., Weil, F., Leoni, J. 2007. Mitochondria dysfunction and cellular stress progression after ultravioleta B irradiation in human keratinocytes. Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine. 24: 115-122.

Piao, M.J., Kim,K.C., Zheng, J., Yao, C.W., Cha, J.W., Boo, S.J., Yoon, W.J., Kang, H.K., Yoo, E.S., Koh, Y.S. 2014. The ethyl acetate fraction of *Sargassum muticum* attenuates ultravioleta B radiation-induced apoptotic cell death via regulation of MAPK-and caspase-dependent signaling pathway in human HaCat keratinocytes. Pharm Biol. 52(9): 1110-8.

Reynolds, E. S 1963. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Journal Cell Biology, 17: 208-212.

Romaniuk, M.S., Bura, M.V., Mandzynets, S.M., Sanagursky, D.I. 2014. Influence Low-Intensity laser irradiation on the ultrastructural organization of Loach embryo cells. Cytology and Genetics. 38: 171-174.

Rowland, F.S. 2006. Stratospheric ozone depletion. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 361:769-790.1-9.

Russo, R., Bonaventura, R., Mstranga, V. 2014. Time- and dose-dependent gene expression. In sea urchin embryos expose to UVB. *Marine Environmental Research*. 93: 85-92.

Scholtz, G. 1994. Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, Berlin, 38: 175 – 187.

Simões-Costa, MS., Pacheco, C., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., Ammar, D. 2005. Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustavea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Rev. Bras. Zool.* 22: 501-508.

Shanklin, J. 2010. Reflections on the ozone hole. *Nature*, v. 465, n. 7294, p. 34-35.

Spurr, A. R. 1969. A low viscosity epoxy resin-em bedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research*, 26: 31-43.

Suen, D., Norris, K.L., Youle, R.J. 2008. Mitochondria dynamics and apoptosis. *Genes e Development*. 22: 1577-1590.

Steller, H.; Suzanne, M. Shaping. 2013. organisms with apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, v. 20, n. 5, p. 669-675.

Svanfeldt, K., Lundqvist, L., Rabinowitz, C., Skold, H.N., Rinkevich, B. 2014. Repair of UV-induced DNA damage in shallow water colonial marine species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 452: 40-46.

Vargas, M.A., Geihs, M.A., Maciel, F.E., Cruz, B.P., Nery, L.E., Allodi, S. 2011. The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulate*: a protective role of melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology Pharmacology* 154: 427-434.

Vernet, M. 2006. Enhanced UV radiation in natural ecosystems as an added perturbation due to ozone depletion. *Photochem. Photobiol.* 82:831-833.

Widel, M., Krzywon, A., Gajda, K., Skonieczna, M., Rzeszowska-Wolny, J. 2014. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 68: 278-287.

Xu, S., G. Peng, Y. Wang, S. Fang, and M. Karbowski. 2010. The ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane turnover. *Mol. Biol. Cell*

Yang, W. 2011. Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Science*, v. 20, n. 11, p. 1781-1789.

Youle, R.J., Blik, A.M. 2012. Mitochondria Fission, Fusion, and Stess. *Science*. 337.

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*, v. 381, n. 2, p. 74-81.

Yu, S., Tang, S. Mayer, G.D., Cobb, G.P., Maul, J.D. 2015. Interactive effects of ultraviolet-B radiation and pesticide exposure on DNA photo-adduct accumulation and expression of DNA damage and repair genes in *Xenopus laevis* embryos. *Aquatic Toxicology*. 159: 256-266.

8. Anexo

Padronização da técnica de MTT para controle da homogeneidade das amostras.

Para verificar a homogeneidade do plaqueamento e o comportamento das amostras durante o experimento foram testadas primeiramente 10 repetições de 50 μL de amostra de embriões em E6 e em seguida cinco diluições (50 μL , 40 μL , 30 μL , 20 μL , 10 μL) realizadas em triplicatas.

Os valores das absorvâncias da curva de diluição, resultaram em uma curva decrescente proporcional aos valores de diluição, assim como as 10 repetições da amostra com 50 μL mantiveram os valores das absorvâncias estáveis, podendo-se concluir que o comportamento da amostra no decorrer do experimento se manteve homogêneo (Figura 16).

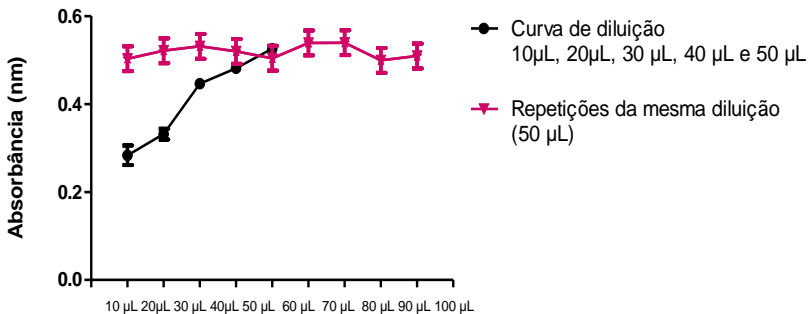


Figura: Controle da técnica de MTT. Curva de diluição da amostra (preto) e comportamento da amostra durante as 10 repetições (vermelho).