

Thaline de Quadros

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B EM EMBRIÕES  
DO CAMARÃO DE ÁGUA DOCE *Macrobrachium olfersii*:  
IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PERFIL  
TRANSCRICIONAL DE GENES ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE  
MITOCONDRIAL**

Tese de doutorado submetida 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, para a obtenção do Grau de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Evelise Maria Nazari

Florianópolis  
2018

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

de Quadros, Thaline

Efeito da radiação ultravioleta B em embriões do  
camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*:  
Identificação e avaliação do perfil transcricional de  
genes envolvidos na atividade mitocondrial /  
Thaline de Quadros ; orientador, Evelise Maria  
Nazari, 2018.

114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.  
Radiação UV. 3. Crustáceo. 4. Embriotoxicidade . 5.  
Biogênese mitocondrial. I. Nazari, Evelise Maria .  
II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. III. Título.

**"Efeito da radiação ultravioleta B em embriões do camarão de água doce  
Macrobrachium olfersii: Identificação e avaliação do perfil transcricional de genes  
envolvidos na atividade mitocondrial"**

Por

**Thaline de Quadros**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (018/2018/PPGBCD) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



---

Prof.(a) Dr.(a) Gelson de Souza Izídio  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Banca examinadora:



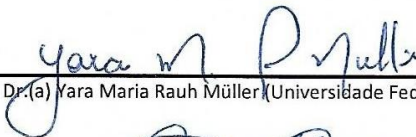
---

Dr.(a) Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



---

Dr.(a) Cintia Monteiro de Barros (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



---

Dr.(a) Yara Maria Rauh Müller (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr.(a) Guilherme de Toledo e Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr.(a) Viviane Glaser (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 11 de dezembro de 2018.





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

DEDICO.



## AGRADECIMENTOS

Uma profunda gratidão invade meu coração e o reconhecimento de todos aqueles que fizeram parte da construção deste sonho faz-se fundamental neste momento.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro, importante para execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento e seus professores por todos os conhecimentos que contribuíram com o meu crescimento profissional.

À minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Evelise Maria Nazari. Posso dizer que tive grande sorte de me inspirar todos os dias em uma das melhores profissionais da área. Você é uma das mulheres mais guerreiras que tive o prazer de conhecer. Sua dedicação, competência e responsabilidade em me orientar mostram o quanto fui abençoada por tê-la como orientadora. Muito obrigada por me conduzir com todo carinho na pesquisa, por me incentivar e me proporcionar crescimento profissional e pessoal em todos os momentos. Muitos dizem que sempre se lembrarão da primeira professora, eu, por outro lado, jamais me esquecerei da última! Viver esta experiência em minha vida e compartilhar contigo foi uma grande honra para mim!

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yara Maria Rauh Müller, obrigada por me ensinar a ver que nos pequenos gestos prestados ao próximo, podemos promover grandes mudanças no mundo. As belas experiências que tive a oportunidade de vivenciar contigo aumentaram ainda mais meu encanto e amor pela ciência. Você sempre terá um lugar muito especial em meu coração, minha grande amiga.



A todos os colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, por todo companheirismo, ajuda e colaboração com a realização deste trabalho.

Ao Dr. Michael Lorenz Jaramillo Bobadilla, por transmitir todos os seus conhecimentos na execução dos procedimentos experimentais.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Rafael da Rosa e ao Cairé Barreto, pela disponibilidade em contribuir com seus ensinamentos e enriquecer minha formação.

Aos laboratórios multiusuários da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB e LCME) e seus técnicos, pelo atendimento e colaboração para a realização das análises necessárias.

Aos membros da banca avaliadora, por fazerem parte deste momento tão importante da minha formação.

À minha família, fonte inesgotável de amor incondicional da minha vida. Aos meus pais Jorge e Elisabete e minha irmã Thiana, agradeço todos os dias por tê-los em minha vida e viver a plenitude do amor que nos une. Somos a prova de que não existe distância quando se prevalece o amor. Obrigada por ser meu porto seguro e por tanto carinho, zelo e cuidado comigo.

Ao meu noivo Rodrigo, por todo amor, incentivo, paciência e apoio prestados durante todo esse tempo. Você faz parte da construção deste sonho.

Por fim, dedico a Ele, meu Senhor e meu Deus, todas as vitórias conquistadas em minha vida.

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

## RESUMO

Estudos utilizando o embrião do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* têm relatado alterações nas células embrionárias após a exposição à radiação UVB, como danos ao DNA e mitocondriais. Considerando a importância da mitocôndria nas células embrionárias, o objetivo deste estudo foi caracterizar os aspectos da morfofuncionalidade mitocondrial em embriões de *M. olfersii*, bem como as respostas mitocondriais frente à exposição à radiação UVB. A partir do transcriptoma de embriões de *M. olfersii*, foi realizada a identificação das sequências codificantes dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1*. A relação filogenética demonstrou forte identidade aminoacídica e caráter altamente conservado das sequências. Os resultados obtidos mostraram que a expressão dos genes analisados foi altamente regulada durante o desenvolvimento embrionário, aumentando seus níveis próximos à eclosão. Além disso, o número de cópias do mtDNA foi maior nos dias embrionários iniciais. O próximo passo foi investigar o efeito da exposição à radiação UVB sobre a morfofuncionalidade mitocondrial utilizando uma dose similar à radiação UVB ambiental. Após 1, 12, 24 e 48 h de exposição, os embriões foram analisados. Foram reconhecidas alterações nucleares e citoplasmáticas, como mitocôndrias com formas anômalas e perda das cristas mitocondriais. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi maior após 1 h da exposição à radiação UVB. Além disso, foram observados maiores níveis de transcritos dos genes *Tfam*, *Nrf1* e *Drp1*, e maior número de cópias do mtDNA nos embriões expostos à radiação UVB. Por fim, a exposição à radiação UVB resultou em um aumento do conteúdo das proteínas PRK8, p62 e LC3II, relacionadas ao processo de mitofagia. Considerando nossos resultados e o conhecimento atual sobre os efeitos da radiação UVB, apontamos a mitocôndria como um importante alvo celular dessa radiação nas células embrionárias de *M. olfersii*. Propomos que as respostas mitocondriais sejam usadas como uma ferramenta para avaliação do estresse ambiental causado pela radiação UVB em embriões de espécies aquáticas.

**Palavras-chave:** radiação UV, Crustacea, embriotoxicidade, biogênese mitocondrial, fusão/fissão mitocondrial, DNA mitocondrial.



## ABSTRACT

Studies using embryo of freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* have reported changes in embryonic cells after the UVB radiation exposure, as DNA and mitochondrial damage. Considering the importance of mitochondria in embryonic cells, the aim of this study was to characterize aspects of mitochondrial morphofunction in embryos of *M. olfersii*, as well as mitochondrial responses to UVB radiation exposure. From the transcriptome of *M. olfersii* embryos, the coding sequences of the *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* and *Drp1* genes were identified. The phylogenetic relationship demonstrated strong aminidic identity and character highly conserved of the sequences. The results showed that the expression of the analyzed genes was highly regulated during embryonic development, increasing their levels close to hatching. In addition, mitochondrial DNA (mtDNA) copies were higher at initial embryonic days. The next step was to investigate the effect of UVB radiation on mitochondrial morphology using an environmental dose of UVB. After 1, 12, 24 and 48 h of exposure, the embryos were analyzed. Nuclear and cytoplasmic alterations were recognized, as mitochondria with anomalous shapes and loss of mitochondrial ridges. The production of reactive oxygen species (ROS) was higher after 1 h to UVB exposure. In addition, higher transcript levels of *Tfam*, *Nrf1* e *Drp1* genes and higher number of mtDNA copies in embryos exposed to UVB radiation were observed. Finally, the UVB radiation exposure resulted in an increase in the content of the PRK8, p62 and LC3II proteins, related to the mitophagy process. Considering our results and current knowledge on the effects of UVB radiation, we have pointed the mitochondria as an important cellular target to this radiation in the embryonic cells of *M. olfersii*. We propose that the mitochondrial responses can be used as a tool for assessing environmental stress caused by UVB radiation in embryos of aquatic species.

**Key words:** UV radiation, Crustacea, embryotoxicity, mitochondrial biogenesis; fusion/fission mitochondrial; mitochondrial DNA.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação do espectro eletromagnético solar com destaque para os comprimentos de onda da radiação UV.....	21
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da formação e dissociação do ozônio.....	22
<b>Figura 3:</b> Processo de dinâmica mitocondrial.....	29
<b>Figura 4:</b> Processo de biogênese mitocondrial.....	31
<b>Figura 5:</b> Ciclo do controle da qualidade mitocondrial.....	33
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo de fêmea ovígera de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	34
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do desenvolvimento embrionário de <i>Macrobrachium olfersii</i> , de acordo com os dias embrionários (E).....	37
<b>Figura 8:</b> Localização da Lagoa do Peri/Florianópolis.....	43
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática delineamento experimental.....	45
<b>Figura 10:</b> Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de <i>Tfam</i> de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	56
<b>Figura 11:</b> Cladograma resultante do alinhamento aminoacídico do gene <i>Tfam</i> .....	57
<b>Figura 12:</b> Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de <i>Nrf1</i> de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	58
<b>Figura 13:</b> Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de <i>Mfn1</i> de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	59
<b>Figura 14:</b> Cladograma resultante do alinhamento aminoacídico do gene <i>Mfn1</i> .....	60
<b>Figura 15:</b> Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de <i>Drp1</i> de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	61
<b>Figura 16:</b> Cladograma resultante do alinhamento aminoacídico do gene <i>Drp1</i> .....	62
<b>Figura 17:</b> Domínios proteicos de <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> .....	63
<b>Figura 18:</b> Níveis de transcritos dos genes <i>Tfam</i> e <i>Nrf1</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	67
<b>Figura 19:</b> Níveis de transcritos dos genes <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> durante o desenvolvimento embrionário de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	68

<b>Figura 20:</b> Mapa de calor ( <i>heatmap</i> ) da clusterização da expressão dos níveis de transcritos dos genes <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> durante os dias embrionários de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	68
<b>Figura 21:</b> Perfis de cópias de mtDNA, gDNA e relação de mtDNA/gDNA durante o desenvolvimento embrionário de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	69
<b>Figura 22:</b> Efeito da radiação UVB sobre a ultraestrutura das células embrionárias de <i>Macrobrachium olfersii</i> analisada por microscopia eletrônica de transmissão.....	71
<b>Figura 23:</b> Efeito da radiação UVB sobre a produção de ERO nas células embrionárias de <i>Macrobrachium olfersii</i> quantificada por citometria de fluxo.....	73
<b>Figura 24:</b> Análise por MeV da expressão dos níveis dos transcritos dos genes <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> em embriões (E7) de <i>Macrobrachium olfersii</i> analisados após 3 h, 6 h e 12 h da exposição à radiação UVB por RT-PCR semi-quantitativa.....	74
<b>Figura 25:</b> Níveis de transcritos dos genes <i>Tfam</i> e <i>Nrf1</i> em embriões (E7) de <i>Macrobrachium olfersii</i> analisados após 12 h de exposição à radiação UVB por RT-qPCR.....	75
<b>Figura 26:</b> Níveis de transcritos dos genes <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> em embriões (E7) de <i>Macrobrachium olfersii</i> analisados após 12 h de exposição à radiação UVB por RT-qPCR.....	76
<b>Figura 27:</b> Perfil do número de cópias de mtDNA/gDNA em embriões (E7) de <i>Macrobrachium olfersii</i> analisados após 12 h de exposição à radiação UVB.....	77
<b>Figura 28:</b> Efeito da radiação UVB sobre a indução de mitofagia nas células embrionárias de <i>Macrobrachium olfersii</i> por citometria de fluxo.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência de oligonucleotídeos iniciadores e tamanho da amplificação de PCR para análises dos genes de interesses em embriões de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	47
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros bioquímicos dos genes <i>Tfam</i> e <i>Nrf1</i> de diferentes espécies de invertebrados e vertebrados .....	64
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros bioquímicos dos genes <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> de diferentes espécies de invertebrados e vertebrados .....	65
<b>Tabela 4:</b> Intensidade de alterações nucleares e mitocondriais das células embrionárias de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	72

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Sequências aminoacídicas dos genes <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> e <i>Drp1</i> selecionadas do GenBank utilizadas para a busca de sequências similares no transcriptoma dos embriões de <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	46
<b>Quadro 2:</b> Anticorpos primários e secundários utilizados nas análises por citometria de fluxo .....	53





## LISTA DE ABREVIATURAS

al	Antênula
an	Apêndices naupliares
ap	Apêndices pós-naupliares
at	Antena
ATP	Trifosfato de adenosina
b	Blastômeros
dg	Disco germinativo
BFC	Bromofluorocarbonos
BSA	Albumina sérica bovina
c	Carapaça
CFC	Clorofluorocarbonos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COXI	Citocromo oxidase, subunidade I
DCFH-DA	Diacetato de 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína
DEPC	Dietilpercarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxirribonuclease
Drp1	Proteína 1 relacionada à dinamina
E	Dia embrionário
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fis1	Proteína de fissão
h	Hora
IgG	Imunoglobulina G
LC3II	Do inglês - <i>LC3-phosphatidylethanolamine conjugate</i>
lo	Lobo óptico
m	Mitocôndria
md	Mandíbula
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
min	Minuto

mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
n	Núcleo
NA	Densidade numérica de células por área
Nrf1	Fator respiratório nuclear 1
Nrf2	Fator respiratório nuclear 2
o	Olho
O	Átomo de oxigênio livre
O <sub>2</sub>	Molécula de oxigênio
O <sub>3</sub>	Molécula de ozônio
OPA1	Proteína 1 de atrofia óptica
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Papila caudal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRK8	Parquina
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
Rpl8	Proteína ribossomal L8
RT-PCR	Transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	Transcriptase reversa - PCR tempo real, do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
sc	Segmentos corporais
SFB	Soro fetal bovino
t	Telson
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v	Vitelo

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
1.1. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS .....	21
1.2. ATIVIDADE MITOCONDRIAL COM ÊNFASE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO .....	27
1.3. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Macrobrachium olfersii</i> .....	34
2. OBJETIVOS .....	41
2.2. OBJETIVOS ESPEFÍFICO .....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	43
3.2. ESTAGIAMENTO DOS EMBRIÕES .....	43
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	44
3.4. PROCEDIMENTO DE IRRADIAÇÃO .....	46
3.5. IDENTIFICAÇÃO <i>in silico</i> DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DOS GENES <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> E <i>Drp1</i> EM EMBRIÕES DE <i>M. olfersii</i> .....	46
3.6. DESENHO DOS INICIADORES .....	46
3.7. ANÁLISE <i>in silico</i> .....	47
3.8. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL .....	48
3.9. SÍNTESE DE cDNA .....	49
3.10. RT-PCR SEMIQUANTITATIVA .....	49
3.11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR .....	50
3.12. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA .....	50
3.13. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	51
3.14. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) .....	52
3.15. CITOMETRIA DE FLUXO .....	53
3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4.1. IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS TRANSCRITOS DOS GENES RELACIONADOS À BIOGÊNESE/FUSÃO/FISSÃO MITOCONDRIAL .....	55

4.2. ANÁLISE DOS PADRÕES DE EXPRESSÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DOS GENES <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> E <i>Drp1</i> DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>M. olfersii</i> .....	66
4.3. ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>M. olfersii</i> .....	69
4.4. EFEITO DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB SOBRE A ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE <i>M. olfersii</i> .....	69
4.5. EFEITO DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB SOBRE A PRODUÇÃO DE ERO DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE <i>M. olfersii</i> .....	72
4.6. EFEITO DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB SOBRE O PERFIL TEMPORAL DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DOS GENES <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> E <i>Drp1</i> .....	74
4.7. NÍVEIS DE TRANSCRITOS DOS GENES <i>Tfam</i> , <i>Nrf1</i> , <i>Mfn1</i> E <i>Drp1</i> APÓS 12 H DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB .....	75
4.8. ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA/gDNA APÓS 12 H DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB	76
4.9. CONTEÚDO PROTEICO DE PRK8, LC3II E p62 APÓS 12 H DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB .....	77
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	91

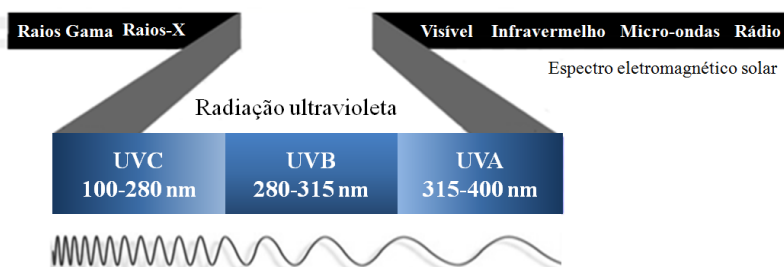


# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

A radiação ultravioleta (UV) é um constituinte do espectro eletromagnético solar, sendo de grande importância para diversos processos biológicos e fundamental para a manutenção da dinâmica dos ecossistemas (DIFFEY, 1991). A radiação UV apresenta uma ampla faixa de comprimento de onda, entre 400 e 100 nm, sendo classificada 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, 1991; 2002) (Figura 1).

**Figura 1: Representação do espectro eletromagnético solar com destaque para os comprimentos de onda da radiação UV.**



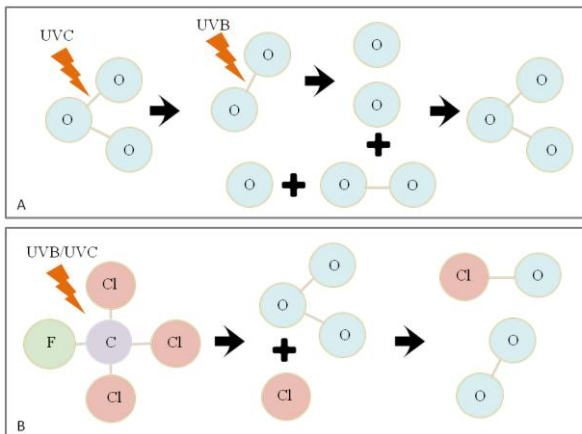
UVC: radiação ultravioleta C; UVB: radiação ultravioleta B; UVA: radiação ultravioleta A.

**Fonte:** Da própria autora (2018).

Os níveis de incidência de radiação UV na superfície terrestre são controlados pela camada de ozônio. Essa camada está localizada na estratosfera (10 a 50 km de altitude) e é formada pelas moléculas de ozônio ( $O_3$ ) que, por sua vez são constituídas pela associação de um átomo livre de oxigênio (O) com uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ) (DIFFEY, 1991; 2002; ROWLAND, 2006). Através de um processo natural e dinâmico, observa-se um balanço constante de formação e dissociação da molécula de ozônio, que é dependente da energia da radiação UV para a quebra ou restabelecimento das ligações químicas entre o O e  $O_2$  (Figura 2).

**Figura 2: Representação esquemática da formação e dissociação do ozônio.**

Radiação UVC dissocia a molécula de ozônio em uma molécula de oxigênio e um átomo livre de oxigênio. Radiação UVB dissocia a molécula de oxigênio em dois átomos livres de oxigênio. Cada átomo de oxigênio se liga a uma molécula de oxigênio formando novamente a molécula de ozônio (A). Radiações UVB/UVC promovem a liberação do átomo de cloro que se liga à molécula de ozônio, resultando na formação do monóxido de cloro e na molécula de oxigênio, impedindo a formação da molécula de ozônio (B).



UVC: radiação ultravioleta C; UVB: radiação ultravioleta B; O: átomo livre de oxigênio; O<sub>2</sub>: molécula de oxigênio; O<sub>3</sub>: Molécula de ozônio; Cl: cloro; F: flúor; C: carbono.

**Fonte:** Adaptado de Crutzen, (1974) e Molina e Rowland, (1974).

A energia da radiação UV é inversamente relacionada ao seu comprimento de onda (PAUL et al., 2003). Assim, a radiação UVC é a mais energética, sendo completamente utilizada nas reações fotoquímicas de dissociação e formação do ozônio, não atingindo a superfície terrestre em níveis significativos (KIRCHHOF et al., 2000). No entanto, a absorção da radiação UVC pela camada de ozônio é relativamente recente na história da Terra, datando de dois bilhões de anos atrás, e a sua incidência tem sido relatada como um dos principais fatores que limita o desenvolvimento da vida terrestre (BJORN et al., 1999).

Grande parte da energia da radiação UVB é utilizada nas reações fotoquímicas de dissociação e formação do ozônio, e cerca de 5 a 10% desta radiação é capaz de atravessar a camada de ozônio e atingir a superfície terrestre. Por sua vez, cerca de 90 a 95% da radiação UVA,



por possuir menor energia intrínseca, é capaz de atravessar a camada de ozônio e atingir a superfície terrestre (PFEIFER et al., 2005; VERNET, 2006; MAVERAKIS et al., 2010).

Contudo, a camada de ozônio vem apresentando alterações na sua composição devido a causas naturais e antrópicas, que resultam no aumento da intensidade de radiação UVB que atinge a superfície terrestre. Essa 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 (CFC) e bromofluorocarbonos (BFC) na redução da camada de ozônio. Na estratosfera, a radiação UV também é capaz de dissociar esses compostos, liberando moléculas de bromo, flúor e cloro. Por reações fotoquímicas, essas moléculas ligam-se às moléculas de ozônio, comprometendo assim a dinâmica da formação da camada de ozônio (CRUTZEN, 1974; MOLINA E ROWLAND, 1974) (Figura 2). Essa descoberta foi se consolidando no meio científico e em 1995, Molina, Rowland e Crutzen receberam o Prêmio Nobel de Química

([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1995/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1995/)).

Desde então, tem-se registrado uma diminuição do ozônio estratosférico em decorrência de emissão de CFC e BFC na atmosfera pela ação humana (BRASSEUR et al., 1985; FANG et al., 2018; YADAV et al., 2018).

Na década de 1980, baseados nos estudos realizados por Molina, Rowland e Crutzen, os cientistas Joseph Farman, Brian Gardiner e Jonathan Shanklin constataram a existência do chamado buraco de ozônio antártico na região Antártica (FARMAN et al., 1985; KIRCHHOFF et al., 1996; SHANKLIN, 2010). Esse fato contribuiu igualmente para o aumento da UVB na superfície terrestre, sobretudo na região sul da América do Sul, onde os índices desta radiação têm se mostrado elevados, principalmente nos meses de primavera e verão (KARENTZ et al., 2001; RONINSON et al., 2015; PASSAGLIA et al., 2015; UNEP, 2017; NÚÑES-PONS et al., 2018). Em meados da década de 1980, através de um tratado internacional, criou-se o Protocolo de Montreal, visando o comprometimento dos países em acabar e substituir o uso dos principais compostos que contribuem para a destruição da camada de ozônio (<http://www.protocolodemontreal.org.br/>).

A incidência dos níveis de radiação UV na superfície terrestre depende ainda de fatores, como o ângulo de elevação solar, altitude e localização geográfica, cobertura das nuvens, nível de poluição regional

e a presença de superfícies como a água, areia ou neve (MAVERAKIS et al., 2010).

Ao atingir a superfície terrestre, a radiação UV participa de diferentes processos de importância biológica. A radiação UVA fornece energia luminosa para a fotossíntese e atua na ativação da enzima fotoliase em alguns organismos (DONG et al., 2008; LI et al., 2015; MURATA et al., 2017). A radiação UVB contribui para a orientação visual de espécies de aves, peixes e de artrópodes (LAND E NILSSON, 2002) e é necessária para a síntese de vitamina D em humanos (GODAR et al., 2012; O'SULLIVAN et al., 2017).

Por outro lado, a radiação UVB tem sido considerada um estressor natural que afeta diversos mecanismos biológicos, fato esse que desperta o interesse pelos estudos dos seus efeitos fotobiológicos na biosfera. Dependendo da dose recebida, a radiação UVB pode desencadear reações adversas, como queimaduras de pele (eritema), envelhecimento precoce da pele, catarata e câncer de pele (NASSER et al., 2010; D'ORAZIO et al., 2013; SOLA E LORENTE, 2015; GUERRA et al., 2018).

A radiação UVB pode também atingir ambientes aquáticos dependendo das propriedades da coluna d'água como transparência e turbidez, induzindo efeitos fotobiológicos em profundidades de até 30 metros (KARENTZ E LUTZE, 1990; 2001; SINHA et al., 2002; HÄDER, et al., 2003; 2011; BANCROFT et al., 2007; NAZARI et al., 2013). Alguns organismos aquáticos desenvolveram estratégias físicas e comportamentais para amenizar os efeitos nocivos provocados pela exposição à radiação UVB (EPEL et al., 1999; SCHUCH et al., 2015). A presença de cascas, conchas ou carapaças exercem uma barreira física contra a radiação, assim como o comportamento de abrigar-se em locais protegidos oferece proteção aos organismos (CUBILLOS et al., 2015). Porém, os ovos e as larvas depositados em regiões de águas rasas e claras normalmente não disponibilizam desses mecanismos de defesa, ficando expostos à radiação UVB durante as etapas mais sensíveis do seu ciclo de vida (CYWINSKA et al., 2000; DAHMS E LEE, 2010; WANG, et al., 2010).

Estudos demonstram que as espécies apresentam sensibilidade diferenciada frente à exposição à radiação UVB, refletindo em variados padrões de efeitos nocivos (CROTEAU, et al., 2008; CAMPANALE et al., 2011; HUREM et al., 2018). Os efeitos da radiação UVB foram inicialmente relatados abordando ecossistemas marinhos, com pesquisas enfocando animais adultos, juvenis, larvas e embriões de espécies de vertebrados e invertebrados (GOUVEIA et al., 2005; FUKUNISHI et

al., 2013 BALAZS et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2018). Dentre os invertebrados, destacam-se os trabalhos com ouriços do mar, os quais relataram os efeitos da radiação UVB sobre a morfologia e fisiologia de embriões e larvas, além de danos ao DNA e estresse celular (NAHON et al., 2009; BONAVENTURA et al., 2017; ZHAO et al., 2018). Em gastrópodes expostos à radiação UVB foi demonstrado um aumento na taxa de mortalidade e atraso no desenvolvimento embrionário e larval (FISCHER et al., 2014). Em crustáceos, estudos revelam os efeitos da radiação UVB em larvas e embriões, sendo relatada a diminuição do tamanho dos indivíduos e atraso no desenvolvimento embrionário (CONNELLY et al., 2009; MORESINO et al., 2011; KIM et al., 2015; MÜLLER et al., 2018). Além das respostas reconhecidas nesses organismos, estudos moleculares têm identificado alterações na expressão gênica durante as fases iniciais de desenvolvimento induzidas pela exposição à radiação UVB (NUÑEZ et al., 2012; RUSSO et al. 2014; DESPIC et al., 2017; PUTHUMANA et al., 2017).

Os efeitos adversos amplamente reportados estão relacionados com a capacidade da energia da radiação UVB em penetrar nas células dos organismos expostos. Nas células animais, o principal cromóforo da radiação UVB é a molécula de DNA (HORNECK, 1995; CADET et al., 2005; SCHUCH et al., 2017). Este fato ocorre devido a faixa de comprimento de onda da radiação UVB coincidir com a absorvância máxima da molécula de DNA, levando à formação de dímeros de pirimidina ciclobutano e de 6-4 fotoprodutos (YOU, 2001; YANG, 2011). Os dímeros de pirimidina ciclobutano caracterizam-se pela formação de ligações covalentes entre carbono-carbono de pirimidinas adjacentes, correspondendo a cerca de 80-90% dos danos e podem inibir a transcrição e replicação do DNA (SINHA E HADER, 2002; BANASZAK, 2003). Já os 6-4 fotoprodutos são formados pelas ligações entre carbono 6 - carbono 4 de pirimidinas 2 adjacentes e correspondem a cerca de 10-20% dos danos ao DNA induzidos pela radiação UVB (HÄDER et al., 2003; YANG, 2011). Além disso, alterações na estrutura nuclear, como a perda da integridade da membrana nuclear, bem como a presença de fragmentação e/ou condensação da cromatina também foram documentados após a exposição à radiação UVB (MIGUEL et al., 2002; QUADROS et al., 2016).

No citoplasma, ao entrar em contato com moléculas como a água, a energia da radiação UVB é capaz de formar espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem a peroxidação lipídica, sendo responsável por alterações na permeabilidade das membranas celulares e danos a diversas organelas citoplasmáticas (NAZARI et al., 2010;

HOLLMAN et al., 2015; KIM et al., 2015). A mitocôndria é considerada a principal fonte de produção de ERO nas células eucarióticas e estima-se que até 90% da sua produção seja devido à fosforilação oxidativa (BALABAN et al., 2005; ZOROV et al., 2014). A geração de grupos superóxido ( $O_2^-$ ) na matriz mitocondrial leva à formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é liberado no citoplasma celular (MURPHY, 2009). Sistemas naturais de eliminação de radicais livres são requeridos pela célula, onde através da atividade enzimática ou não enzimática, promovem a sua eliminação ou então impedem sua transformação em produtos mais tóxicos. O sistema enzimático de defesa são compostos pelas enzimas Glutathione-Peroxidase, Catalase, Metionina-Redutase e Superóxido-Dismutase, já o sistema não enzimático necessitam ser absorvidos pela alimentação apropriada e são compostos pelas vitaminas lipossolúveis, vitaminas hidrossolúveis e os oligoelementos (HALLIWEL et al., 1990). Porém, comprometimentos causados pela exposição à radiação UVB na cadeia transportadora de elétrons, promovem uma maior produção de  $O_2^-$  e, portanto, uma liberação aumentada de  $H_2O_2$  para o citoplasma, exercendo uma toxicidade celular (PAZ et al., 2007; SCHUCH et al., 2017; BRAND et al., 2018).

Entre as organelas comprometidas pela exposição à radiação UVB, destacam-se as mitocôndrias (JUGÉ et al., 2016). Estudos relatam a perda da permeabilidade e a despolarização da membrana mitocondrial após a exposição à radiação UVB, promovendo diretamente a liberação do citocromo c, desencadeando o início da sinalização apoptótica mediada por caspases (KAM et al., 2013; WALSH et al., 2017). Além disso, a ação direta desta radiação sobre o DNA mitocondrial (mtDNA) também está relacionado com a ativação da morte celular programada (FACHAL et al., 2014; BÖHM et al., 2016).

Embora as alterações celulares provocadas pela exposição à radiação UVB sejam amplamente documentadas, elas representam uma pequena porção das respostas biológicas à radiação UVB conhecidas, sendo fundamental a ampliação dos estudos abordando diferentes modelos biológicos. Tendo em vista o papel essencial desempenhado pela mitocôndria durante o metabolismo, fisiologia e desenvolvimento embrionário, torna-se relevante a compreensão das respostas mitocondriais frente à exposição à radiação UVB.

## 1.2 ATIVIDADE MITOCONDRIAL COM ÊNFASE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas que participam da manutenção de vários processos celulares, pois são responsáveis pela maior produção líquida de energia, através da síntese de adenosina trifosfato (ATP) gerada por fosforilação oxidativa (KENNEDY E LEHNINGER, 1950; 1951). O surgimento desta organela é baseado na Teoria da Endossimbiose proposta por Lynn Margulis na década de 1960, a qual sugere que a partir de uma relação de endossimbiose promovida pela fagocitose de um procarionte aeróbio por uma célula pré-eucarionte anaeróbia, as mitocôndrias teriam surgido nas células eucarióticas (ALBERTS et al., 2010).

As mitocôndrias apresentam-se nas células sob a forma arredondada ou alongada envolta por duas membranas lipídicas altamente especializadas, a membrana externa e a membrana interna, e entre ambas é encontrado um espaço denominado intramembranoso. A membrana mitocondrial interna apresenta-se paralela ao contorno da membrana mitocondrial externa, invaginando-se em direção à matriz para formar as numerosas cristas mitocondriais. Aderidos às cristas mitocondriais, encontram-se os cinco complexos enzimáticos, responsáveis pela produção de energia, denominados de cadeia respiratória. Na matriz mitocondrial são encontradas as principais enzimas responsáveis pelo ciclo de Krebs, pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, além de RNAs, ribossomos e o mtDNA (ALBERTS et al., 2010).

Além do desempenho das mitocôndrias em fornecer suporte energético às células, esta organela apresenta uma grande riqueza de papéis na fisiologia celular. Entre eles, destaca-se a participação da mitocôndria na regulação da homeostase de cálcio intracelular e metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de componentes celulares (como ácidos graxos, aminoácidos, purinas e timinas), produção de radicais livres, além de possuir um papel fundamental no controle do início da morte celular por apoptose, processo crucial durante o desenvolvimento embrionário (McBRIDE et al., 2006; NUNNARI et al., 2012; CHOWDHARY et al., 2017; REN et al., 2017).

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e organizam-se formando malhas ou redes mitocondriais, alterando sua forma, tamanho e distribuição dentro da célula (BOLDOGH et al., 2006; XIE et al., 2018). A fim de manter a homeostase da bioenergética celular em resposta às mudanças das necessidades intercelulares durante o

desenvolvimento embrionário, a rede mitocondrial é regulada por dois processos dinamicamente opostos: fusão e fissão mitocondrial (SESAKI E JENSEN, 1999; CHAN, 2006; WESTERMANN, 2010; TILOKANI, et al., 2018). O equilíbrio entre estes dois processos irá determinar a morfologia mitocondrial, dependendo das demandas energéticas dentro de uma célula (BENARD E KARBOWSKI, 2009). Quando prevalece o processo de fissão mitocondrial, observam-se mitocôndrias fragmentadas e esféricas, enquanto que um excesso de fusão resulta em mitocôndrias tubulares e alongadas (WAI et al., 2016). Essa dinâmica mitocondrial ocorre em resposta a sinais intra ou extracelulares; às oscilações nas demandas metabólicas, as quais podem alterar o número e a distribuição da organela para que esta se adapte as necessidades funcionais da célula; às necessidades de manutenção e eliminação do material genético mitocondrial e degradação da organela (BEREITER-HAHN, 1994; LIESA et al., 2009).

As principais proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial são GTPases codificadas nuclearmente, apontando uma origem evolutiva comum. Diferentes organismos modelo, incluindo levedura, *Drosophila sp.* e *Caenorhabditis elegans* contribuíram para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos nestes processos (PAGLIUSO et al., 2018).

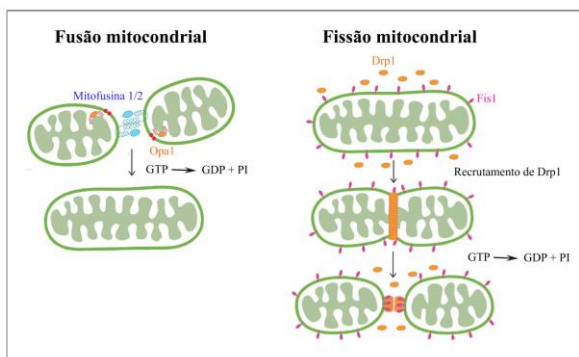
O processo de fusão mitocondrial caracteriza-se pela união de duas ou mais mitocôndrias, sendo mediado pelas proteínas mitofusina 1 (Mfn1) e mitofusina 2 (Mfn2), localizadas na membrana externa da mitocôndria, e pela proteína 1 de atrofia óptica (Opa1), localizada na membrana interna mitocondrial. Essas proteínas têm sua ação ativada pela hidrólise de guanosina trifosfato (GTP), através do domínio GTPase presente nas mitofusinas, a fim de promover a fusão da membrana mitocondrial externa das mitocôndrias adjacentes (ZORZANO et al., 2010; ISHIHARA et al., 2013). O processo de fusão das membranas mitocondriais externa e interna ocorre em duas etapas distintas, onde as mitofusinas presentes na membrana externa são responsáveis pela fusão das mesmas, enquanto que a OPA1, presente na membrana interna, atua fundindo as membranas internas de duas mitocôndrias (LIESA et al., 2009).

Além do processo de fusão mitocondrial, as proteínas envolvidas neste processo são requeridas para a estabilidade do mtDNA e também estão associadas com a manutenção da cadeia respiratória e do potencial de membrana mitocondrial. Esses mecanismos são essenciais para o desenvolvimento embrionário e sobrevivência celular em fases

posteriores do desenvolvimento (CHEN et al., 2003; CHAN et al., 2012; YOULE et al., 2012).

Por outro lado, o processo de fissão mitocondrial é caracterizada pela divisão de uma mitocôndria em duas ou mais novas mitocôndrias, sendo mediado pela proteína 1 relacionada à dinamina (Drp1) e pela proteína de fissão (Fis1) (KRAUS et al., 2017). A Drp1 está localizada principalmente no citosol e, uma vez ativada, transloca-se para a membrana mitocondrial externa e liga-se à proteína Fis1, em locais denominados sítios de constrição (MOZDY et al., 2000; LOSON et al., 2013). Após ser recrutada para a mitocôndria, a Drp1 se polimeriza em torno da organela e, através da hidrólise do GTP, altera a sua conformação para constrição as membranas externa e interna, ocasionando a fissão da mitocôndria (MEARS et al., 2011). Esse processo é essencial para o crescimento e manutenção do número adequado de mitocôndrias de cada célula durante a proliferação celular (Figura 3) (CHANG et al., 2010; ISHIHARA et al., 2015).

**Figura 3: Processo de dinâmica mitocondrial.** Mecanismo de fusão mitocondrial, com a atuação das proteínas mitofusinas 1/2 mediando a fusão das membranas mitocondriais externas e da proteína Opa1, a fusão das membranas mitocondriais internas. Mecanismo de fissão mitocondrial, demonstrando o recrutamento da proteína Drp1 do citosol para receptores localizados na membrana mitocondrial externa, como Fis1. Drp1 organiza-se em torno do local da fissão permitindo a constrição das membranas mitocondriais.



Opa1: proteína 1 de atrofia óptica; Drp1: proteína 1 relacionada à dinamina; Fis1: proteína de fissão. **Fonte:** Adaptado de Huang, et al. (2009).

O número adequado de mitocôndrias nas células depende do equilíbrio entre os processos de fusão e fissão mitocondrial e da biogênese de novas mitocôndrias (CHEN et al., 2010). A biogênese

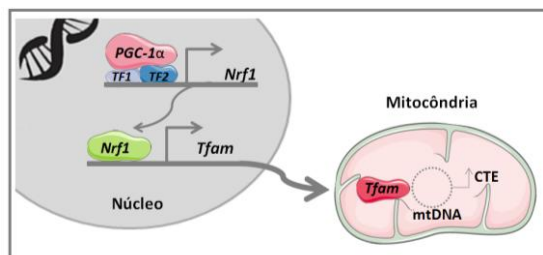
mitocondrial pode ser definida como o crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes, sendo um processo ativo durante a organogênese embrionária, devido à ativação do metabolismo oxidativo e crescimento durante este período. Este processo regula o conteúdo mitocondrial e permite que as células maduras mantenham o número apropriado de cópias de mtDNA para realizar suas funções especializadas, além de ser crucial para a manutenção da homeostase, estabilidade e sobrevivência celular em resposta ao estado metabólico celular, estresse ambiental, bem como processos de divisão, renovação e diferenciação celular (JORNAYVAZ et al., 2010; NGO et al., 2011; PALIKARAS et al., 2015).

A regulação do processo da biogênese mitocondrial é complexa e requer a expressão coordenada do genoma nuclear (gDNA) e do mtDNA (YOSHIMITSU et al., 2018). Cada mitocôndria apresenta múltiplas cópias de mtDNA, sendo este formado de uma cadeia de dupla fita circulares e apresenta 13 genes que codificam proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (OXPHOS), e 24 genes envolvidos na tradução de mtDNA (2 rRNAs e 22 tRNAs). Esse número de genes codifica apenas 5% dos produtos necessários para o funcionamento mitocondrial. Os genes responsáveis pela biogênese mitocondrial estão localizados no gDNA, incluindo os que codificam para os fatores de transcrição mitocondriais e para proteínas presentes nos complexos I, II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (JORNAYVAZ et al., 2010).

O processo de biogênese mitocondrial ocorre através da ativação do coativador  $1\alpha$  do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxisoma (PGC- $1\alpha$ ), onde interage com fatores de transcrição respiratórios nucleares 1 e 2 (*Nrf1* e *Nrf2*), os quais são conhecidos como reguladores do processo de transcrição e replicação mitocondrial (VIRBASIUS et al., 1993; LIN et al., 2005). Com maior importância, o *Nrf1*, uma vez ativado, modula a expressão de múltiplas proteínas mitocondriais e codificação nuclear, dentre elas, a expressão do fator de transcrição mitocondrial A (*Tfam*) (EKSTRAND et al., 2004; SHI et al., 2012; NGO et al., 2014). O *Tfam* é um fator de transcrição que migra do núcleo para a mitocôndria, ligando-se a região promotora do mtDNA, regulando a transcrição dos 13 genes mitocondriais. Além disso, o *Tfam* está envolvido tanto no início da transcrição das principais proteínas mitocondriais, quanto para o início da transcrição e replicação do mtDNA, sendo um potente estimulador da duplicação do mtDNA (Figura 4) (KUKAT et al., 2015). O efeito final da ativação desses fatores de transcrição é o aumento do número de mitocôndrias nas células (VIRBASIUS E SCARPULLA, 1994; VIÑA, 2009).



**Figura 4: Processo de biogênese mitocondrial.** A PGC-1 $\alpha$  se liga à região promotora de seus genes alvo como os *Nrf1/2* e estimula sua expressão. *Nrf1* codifica proteínas destinadas à mitocôndria como o *Tfam*. Após a tradução, a proteína *Tfam* é importada para o interior das mitocôndrias onde atua como um fator de transcrição do mtDNA e indutor da expressão de proteínas codificadas mtDNA que, juntamente com proteínas transcritas pelo gDNA são montadas para formar complexos de multisubunidades que se tornam parte CTE.



PGC-1 $\alpha$ : Coativador 1  $\alpha$  do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxisoma; *Nrf1/2*: Fatores respiratórios nucleares 1 e 2; *Tfam*: fator de transcrição mitocondrial A; mtDNA: DNA mitocondrial; CTE: cadeia transportadora de elétrons.

**Fonte:** Adaptado de Ljubcic et al. (2010).

O desequilíbrio entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, a perda da atividade mitocondrial, dobramento incorreto e agregação de componentes proteicos resultantes de mutações genéticas ou estresse ambiental são importantes causas da disfunção da rede mitocondrial (ROSS et al., 2013; KOTIADIS et al., 2014). Sendo assim, o número de cópias de mtDNA é estritamente controlado por sua transcrição e replicação, porém os mecanismos não são totalmente compreendidos (FALKENBERG et al., 2007; HERBERS et al., 2018). A resposta dos ciclos de fusão e fissão mitocondrial às mudanças no metabolismo são propostas para equilibrar dois processos em condições adversas: a compensação de danos por fusão e a eliminação de danos por fissão (CERVENY et al., 2007; WESTERMANN, 2010). O aumento do processo de fusão originam mitocôndrias filamentosas, as quais maximizam a capacidade de fosforilação oxidativa frente ao estresse, ajudando a manter o equilíbrio metabólico celular com a dissipação de energia (SKULACHEV, V.P. 2001). Além disso, a fusão permite a complementação funcional das mitocôndrias, onde componentes danificados ou mtDNA mutado podem ser compensados por componentes funcionais de mitocôndrias saudáveis (NAKADA et

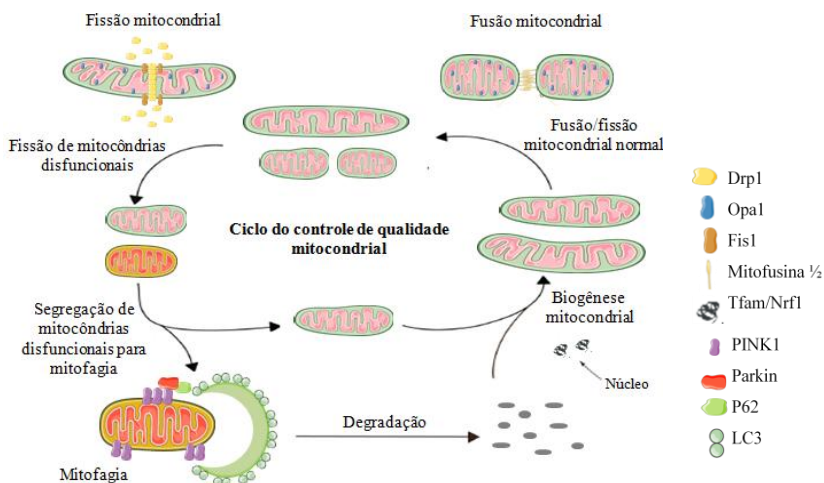
al., 2001). Em contrapartida, o processo de fissão atua na identificação de mitocôndrias disfuncionais e sua subsequente remoção através do processo de mitofagia (TWIG et al., 2008; BRURMAN, et al., 2017).

O processo de mitofagia é requerido para a manutenção do controle de qualidade da rede mitocondrial e pode atuar de acordo com a demanda metabólica celular, sendo de grande relevância biológica (PICKLES et al., 2018). Esse processo representa um tipo de autofagia seletiva onde ocorre a segregação de mitocôndrias disfuncionais da rede mitocondrial saudável por fissão mitocondrial, sendo assim englobadas por membranas autofágicas e destinadas a lisossomos, levando à formação de autofagossomos. Dentro dessas organelas líticas, as mitocôndrias são degradadas e seus produtos de decomposição são disponíveis para o metabolismo (ANZELL et al., 2018). Estudos relatam a existência de uma ligação funcional entre a dinâmica mitocondrial e o processo de mitofagia, onde a segregação de mitocôndrias disfuncionais é realizada pelo processo de fissão, seguida da inibição da sua maquinaria de fusão mitocondrial (WESTERMANN et al., 2010; BRURMAN, et al., 2017).

Dentre as vias que detectam mitocôndrias disfuncionais e desencadeiam o processo de mitofagia, a mais conhecida é a mediada pelas proteínas PINK1/Parkina (SEKINE et al., 2018). Em condições saudáveis ocorre rápida degradação da proteína PINK1, a qual depende de um potencial constante de membrana mitocondrial. Com a perda do potencial da membrana em mitocôndrias disfuncionais, a proteína PINK1 é acumulada na membrana mitocondrial externa, e através da fosforilação de suas proteínas, recruta proteínas mitofágicas como a Parkina (membro do complexo E3 ubiquitina ligase). Em seguida, as proteínas receptoras de autofagia (p62/SQSTM1, OPTN, NDP52, TAX1BP1 e NBR1) interagem com a proteína LC3 para recrutar autofagossomas que irão circundar as mitocôndrias marcadas com o receptor e transportá-las para os lisossomos, ocorrendo assim à degradação mitocondrial (YOULE E NARENDRA, 2011; WILLIAMS E DING, 2015; BIEL E RAO, 2018).

Nesse contexto, o sistema de controle da qualidade mitocondrial é sustentado pelos processos de biogênese mitocondrial, fusão e fissão mitocondrial, assim como a mitofagia, os quais desempenham um papel essencial na homeostase da rede mitocondrial, tanto em condições fisiológicas como patológicas (Figura 5) (PICKLES et al., 2018; YOO et al., 2018).

**Figura 5: Ciclo de controle da qualidade mitocondrial.** O ciclo de controle da qualidade mitocondrial envolve um processo dinâmico de fusão/fissão, biogênese e mitofagia. Mitocôndrias disfuncionais são segregadas através da fissão da rede mitocondrial saudável. Através do processo de mitofagia, a formação do autolisossomo degradará a mitocôndria. A célula irá reciclar os aminoácidos e ácidos graxos para permitir que a manutenção da rede mitocondrial saudável através da biogênese mitocondrial.



Drp1: proteína 1 relacionada à dinamina, Opa1: proteína 1 de atrofia óptica; Fis1: proteína de fissão; *Tfam*: fator de transcrição mitocondrial A; *Nrf1*: fatores respiratórios nucleares 1.

**Fonte:** Adaptado de Anzel et al. (2018).

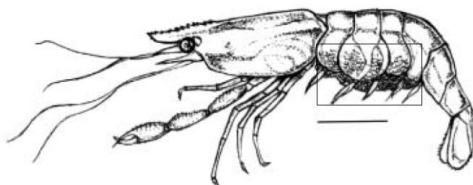
Considerando que os processos mitocondriais nas células são fortemente regulados em resposta ao requerimento energético, às mudanças fisiológicas e ao estresse, e poucos são os estudos que abordam os níveis de replicação do mtDNA e expressão de transcritos mitocondriais durante o desenvolvimento embrionário, a realização de estudos que visam compreender tais eventos mostram-se relevantes e inovadores para as áreas de biologia do desenvolvimento e embriotoxicidade, além de elucidar esses eventos moleculares em diferentes organismos.

### 1.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Macrobrachium olfersii*

*Macrobrachium olfersii* é um crustáceo decápode da família Palaemonidae, constituída por camarões de água doce, popularmente conhecido como pitu. Essa espécie é a mais representativa do seu gênero, podendo ser encontrados em corpos de água doce e salobra das Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (HOLTHUIS, 1952). Na Ilha de Santa Catarina, esses animais são encontrados nas margens claras e rasas da Lagoa do Peri (MÜLLER et al., 1999; AMMAR et al., 2001), onde está situada em área de proteção ambiental e é um local isento de efluentes domésticos e industriais, cujas águas são destinadas para consumo humano (CECA, 1996; LISBOA et al., 2011). *M. olfersii* desempenha um papel fundamental para a manutenção de seu ambiente, pois são animais detritívoros que participam da cadeia alimentar de peixes e aves aquáticas, atuando assim na ciclagem de energia desses ambientes (MÜLLER et al., 1999).

As fêmeas ovígeras de *M. olfersii* apresentam uma câmara incubadora na região ventral do abdome, formada pela dilatação lateral da carapaça, onde transportam cerca de 1.900 ovos embrionizados durante todo o período de incubação (NAZARI et al., 2003). Além disso, essa espécie possui o corpo recoberto por uma carapaça translúcida e a câmara incubadora não apresenta uma carapaça de revestimento ventral, de modo que os ovos ficam expostos a todas as condições presentes no meio ambiente (Figura 6).

**Figura 6: Esquema representativo de fêmea ovígera de *Macrobrachium olfersii*.** Área em destaque mostra a localização da câmara incubadora e dos ovos. Barra de escala = 1 cm.



**Fonte:** Adaptado de Nazari et al., 2003.

Nos estágios iniciais do desenvolvimento, o tamanho médio dos ovos de *M. olfersii* é 0,47 mm no maior eixo e 0,38 mm no menor eixo (NAZARI et al., 2003). O desenvolvimento embrionário dessa espécie

ocorre durante 14 dias em temperatura de 24°C ( $\pm 1$ ). O estagiamento dos embriões pode ser realizado utilizando diferentes critérios: (i) dia embrionário (E), no qual cada período de 24 h corresponde a um dia embrionário; (ii) eventos/processos, sendo reconhecidos eventos como clivagem, gastrulação, morfogênese e organogênese; (iii) estagiamento percentual, onde 0% corresponde ao momento da postura dos ovos e 100% ao momento da eclosão; (iv) por períodos do desenvolvimento, sendo classificados em períodos pré-naupliar, naupliar e pós-naupliar (HELLUY E BELTZ, 1991; SANDEMAN e SANDEMAN, 1991; MÜLLER et al., 2004; SIMÕES-COSTA et al., 2005). O estagiamento embrionário adotado neste trabalho foi por dia embrionário (E).

As características do desenvolvimento embrionário de *M. olfersii* apresentadas a seguir foram descritas por Müller et al., (2003; 2004) e por Simões-Costa et al., (2005).

Os ovos de *M. olfersii* são do tipo centrolécito, onde é reconhecida grande quantidade de vitelo concentrada na região central do ovo. Tais características permitem que ocorra a clivagem do tipo meroblástica parcial superficial, uma vez que a grande quantidade de vitelo inviabiliza que todo o citoplasma do ovo se divida. Sendo assim, embrião desenvolve-se na superfície do ovo, característica que facilita a visualização direta das mudanças morfológicas ao longo dos dias embrionários.

No primeiro e segundo dias embrionários (E1 e E2), o núcleo celular divide-se repetidas vezes sem que ocorra a formação dos limites celulares dentro da massa de vitelo, formando as enérgides. Uma vez formadas, as enérgides migram para a periferia do ovo, onde ocorre a formação do blastoderma sincicial. Posteriormente, ocorre a celularização desses núcleos e a formação do blastoderma celular, cujas células passam a ser chamadas de blastômeros. Em E3 ocorre o processo de gastrulação e a formação do disco germinativo, que adquire o formato da letra “V”. Neste período ocorre intensa proliferação celular, tornando o disco germinativo mais espesso e constituído pelos três folhetos embrionários. Além disso, é possível reconhecer o eixo ântero-posterior do embrião, onde as extremidades superiores correspondem ao esboço dos lobos ópticos e a extremidade inferior, ao esboço da papila caudal.

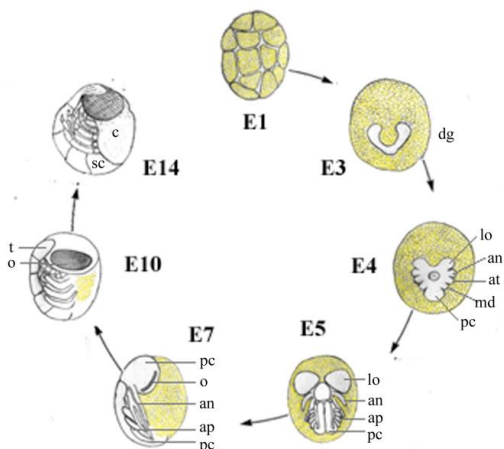
Durante o quarto dia embrionário (E4) ocorre à organização do nauplius, um referencial para o desenvolvimento dos crustáceos (SCHOLTZ, 2000). Em *M. olfersii*, diferente dos camarões de água salgada, o nauplius ocorre em uma fase *in ovo*, sendo chamado de nauplius embrionizado. Neste dia embrionário, o embrião é constituído

pelos lobos ópticos na região anterior do embrião, a papila caudal na região posterior e a formação de três pares de apêndices naupliares: antênulas, antenas e mandíbulas nas regiões laterais.

Durante o quinto e sexto dia embrionário (E5 e E6) organiza-se o pós-nauplius embrionizado inicial, caracterizado pela curvatura da papila caudal, alongamento do embrião do sentido ântero-posterior, crescimento e bifurcação dos apêndices naupliares e surgimento dos apêndices pós naupliares, que são as maxílulas, as maxilas e os primórdios dos segmentos torácicos. No sétimo dia embrionário (E7) é evidenciado o crescimento dorso-ventral do pós-nauplius embrionizado, o início da formação dos olhos pigmentados na porção distal do lobo óptico, crescimento da papila caudal e dos apêndices naupliares e pós-naupliares. No décimo dia embrionário (E10), os olhos laterais apresentam nítida delimitação, assumindo um formato arredondado e ocorre o início da segmentação da papila caudal, a qual resultará na organização do abdome. Além disso, embriões em E10 são caracterizados pelo início dos batimentos do coração e movimentos dos apêndices torácicos e da papila caudal. Nos dias embrionários subsequentes, observa-se um aumento expressivo da região do olho e a carapaça dorsal recobre todo o cefalotórax.

No décimo quarto dia embrionário (E14), os olhos apresentam formato arredondado e ocupam grande parte dos lobos ópticos, sendo recobertos pelo telson. A carapaça dorsal está formada e recobre todo o cefalotórax. Estruturas como o coração, intestino primitivo e os gânglios cerebrais estão formadas, viabilizando a sua funcionalidade após a eclosão. Ainda, observam-se movimentos coordenados dos apêndices, acompanhados de espasmos do embrião, os quais contribuem para o rompimento do cório, envelope que recobre o embrião até a eclosão (Figura 7).

**Figura 7: Representação esquemática do desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersii*, de acordo com os dias embrionários (E).**



dg: disco germinativo; lo: lobo óptico; an: antênulas; at: antenas; md: mandíbula; pc: papila caudal; o: olho; ap: apêndices pós-naupliários; t: telson; sc: segmentos corporais; c: carapaça.

**Fonte:** Adaptado de Müller et al. (2004).

A escolha do embrião de *M. olfersii* para avaliar os efeitos da radiação UVB deve-se ao fato desta espécie apresentar algumas características que o qualifica como um bom modelo de estudo, dentre elas podemos destacar: (1) a boa adaptabilidade a ambientes artificiais, o que possibilita a obtenção de desovas em um ambiente controlado de laboratório durante todo o período de incubação; (2) a presença de uma carapaça transparente que recobre o corpo; (3) o acesso aos embriões facilitado pelo fato das fêmeas transportarem os ovos em uma câmara incubadora externa e aberta; (4) o desenvolvimento superficial e a transparência das células embrionárias, o que facilita a visualização direta das mudanças morfológicas ao longo do desenvolvimento; (5) o elevado número de ovos e o tempo de desenvolvimento de 14 dias, que possibilita o acompanhamento sistemático dos dias embrionários e (6) esses animais vivem e se reproduzem em águas rasas e claras, onde a elevada incidência da radiação UVB penetra com a mesma intensidade da superfície (NAZARI et al., 2003; 2013; MÜLLER et al., 2004).

Poucos são os trabalhos sobre os efeitos da radiação UVB em embriões, em particular com espécies de invertebrados aquáticos. É de

conhecimento geral que os organismos apresentam respostas diferenciadas à radiação UVB, e que os embriões apresentam maior suscetibilidade a agentes estressores, quando comparados aos adultos (EPEL et al., 2003; BANCROFT et al., 2007; RAMÍREZ-DUARTE, et al., 2017). Além disso, os trabalhos disponíveis abordam principalmente os efeitos da radiação UVB na sobrevivência dos embriões, no ritmo de desenvolvimento embrionário e nos comprometimentos durante as metamorfoses larvais (CYWINSKA et al., 2000; BROWMAN et al., 2003; NAHON et al., 2009). Mais escassos ainda são os trabalhos que abordam especificamente os efeitos da radiação UVB sobre as células embrionárias (NAZARI et al., 2010; CAMPANALE et al., 2011; ZENI et al., 2015).

Embora nas últimas décadas tenham se intensificado os estudos sobre os efeitos da radiação UVB, os relatos ainda são escassos na literatura sobre as possíveis alterações na morfofisiologia mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário. As respostas celulares reconhecidas nos embriões de *M. olfersii* expostos à radiação UVB, estão relacionadas à diminuição da proliferação celular (NAZARI et al., 2010; 2013), danos ao DNA com a formação de dímeros de pirimidina (ZENI et al., 2015) e indução de apoptose (SCHRAMM et al., 2017). Contudo, diante dos efeitos da radiação UVB nos eventos celulares citados, é pertinente considerar a mitocôndria também como um alvo celular.

Diante desse panorama e considerando (i) a crescente incidência da radiação UVB nos ambientes aquáticos, (ii) a importância biológica de *M. olfersii* para esses ambientes (iii) a obtenção dos dados da análise transcriptômica de embriões de *M. olfersii* (JARAMILLO et al., 2016), a qual viabiliza estudos em biologia do desenvolvimento e embriotoxicidade e (iv) a escassez de estudos dos efeitos da radiação UVB sobre as respostas mitocondriais nas células embrionárias, o presente trabalho teve como foco analisar os efeitos da radiação UVB sobre os processos envolvidos no controle da qualidade mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*. Porém, este foco ainda é muito amplo, razão pela qual foram definidas algumas questões que este estudo se dedicou a responder:

- 1- Como os genes envolvidos com a biogênese/fusão/fissão mitocondrial se expressam temporalmente no desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*?
- 2- A exposição à radiação UVB promove alterações ultraestruturais das células embrionárias de *M. olfersii*?



- 3- A radiação UVB compromete os processos de biogênese/fusão/fissão mitocondrial nas células embrionárias de *M. olfersii*?
- 4- A mitofagia é uma resposta das células embrionárias de *M. olfersii* expostas à radiação UVB?

Desse modo, a partir dos conhecimentos atuais sobre os efeitos biológicos da radiação UVB, as seguintes hipóteses científicas foram estabelecidas: (i) os níveis dos transcritos dos genes envolvidos na biogênese/fusão/fissão mitocondrial são temporalmente regulados, aumentando sua expressão durante as etapas finais do desenvolvimento embrionário; (ii) a radiação UVB compromete a ultraestrutura das células embrionárias, promovendo alterações na morfologia mitocondrial; (iii) a radiação UVB promove o aumento da biogênese mitocondrial, bem como do número de cópias de mtDNA; (iv) a radiação UVB induz o aumento do processo de fissão mitocondrial acompanhado da indução do processo de mitofagia.

Finalmente, dada a importância dos eventos associados à biogênese/fusão/fissão mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário e a escassez de estudos que abordam os efeitos da radiação UVB sobre esses mecanismos celulares, novas abordagens e o uso de diferentes organismos modelos ampliarão o conhecimento atual sobre o impacto da radiação UVB sobre embriões aquáticos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Caracterizar os aspectos da morfofuncionalidade mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*, bem como as respostas mitocondriais frente à exposição à radiação UVB.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar *in silico* as sequências codificantes dos genes *Tfam* e *Nrf1*, potencialmente associados ao processo de biogênese mitocondrial, e *Mfn1* e *Drp1*, potencialmente associados aos processos de fusão/fissão mitocondrial a partir da análise do transcriptoma de embriões de *M. olfersii*;
- Determinar a relação filogenética das sequências codificantes dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* com espécies correlatas;
- Avaliar o perfil de expressão dos níveis transcricionais dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1*;
- Quantificar o número de cópias do mtDNA durante o desenvolvimento embrionário;
- Avaliar a ultraestrutura das mitocôndrias nas células embrionárias de *M. olfersii*;
- Quantificar a produção de ERO nas células embrionárias de *M. olfersii*;
- Analisar o conteúdo de proteínas PRK8, LC3II e p62, relacionadas ao processo de mitofagia.

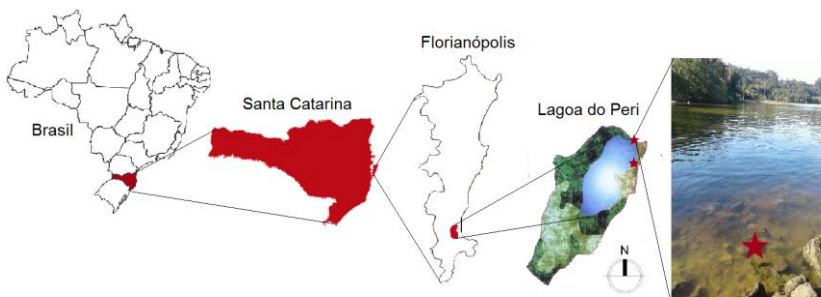


### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Exemplares adultos de camarões *M. olfersii* (machos, n = 20; fêmeas, n = 60) foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina/Brasil (27° 35' S, 48° 35' W) (Figura 8) e transportados para o Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) – Centro de Ciências Biológicas (CCB) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Em laboratório, os camarões foram mantidos em aquários de 60 litros com aeração constante, temperatura de 24° C ( $\pm 1$ ) e em condições de fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, sendo o período claro simulado com a lâmpada Philips TLT 40 W/ 75 RS/96 mW/cm<sup>2</sup>. Os camarões foram alimentados com ração para organismos aquáticos (AlconBottomFish). 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 foram aprovados pelo IBAMA (Autorização Permanente n° 15294-1/2008).

**Figura 8: Localização da Lagoa do Peri/Florianópolis (27° 35' S, 48° 35' W).** Estrela indica o local de coleta do *Macrobrachium olfersii*.



Fonte: Adaptado da Fundação Municipal do Meio Ambiente (FLORAM - <http://www.pmf.sc.gov.br/entidades/floram>)

#### 3.2 ESTAGIAMENTO DOS EMBRIÕES

Antes de cada procedimento experimental, amostras de ovos (n = 10 ovos por fêmea) foram analisadas para o reconhecimento das características morfológicas externas dos embriões e determinação dos

dias embrionários utilizados neste estudo (10X, 35X e 70X, Olympus SHZ), conforme o delineamento experimental descrito abaixo.

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

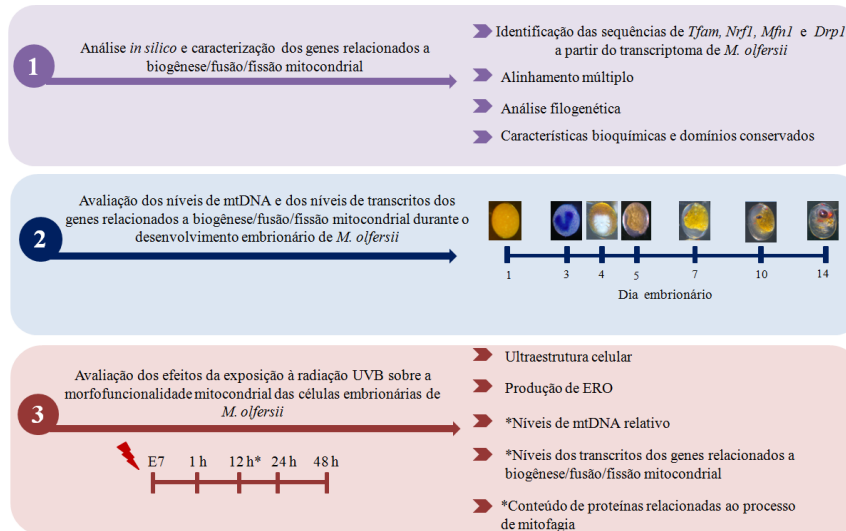
Para compreender as respostas mitocondriais dos embriões de *M. olfersii*, os ensaios realizados foram organizados em três etapas descritas abaixo e ilustradas na Figura 9.

Etapa 1: Análise *in silico* da identificação e caracterização dos transcritos relacionados à biogênese/fusão/fissão mitocondrial, utilizando ferramentas de bioinformática com base no transcriptoma de embriões de *M. olfersii* (JARAMILLO et al., 2016);

Etapa 2: Avaliação dos níveis de mtDNA e dos níveis de transcritos dos genes relacionados a biogênese/fusão/fissão mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*. Para esta etapa, foram selecionados embriões nos dias embrionários E1, E3, E4, E5, E7, E10 e E14.

Etapa 3: Avaliação dos efeitos da exposição à radiação UVB sobre a morfofuncionalidade mitocondrial das células embrionárias de *M. olfersii*, sendo realizada análises (i) da ultraestrutura celular; (ii) da produção de ERO; (iii) dos níveis de mtDNA e dos transcritos dos genes relacionados a biogênese/fusão/fissão mitocondrial e (iv) do conteúdo de proteínas relacionadas ao processo de mitofagia. Para esta etapa, foram selecionados embriões em E7 provenientes de fêmeas ovígeras obtidas em laboratório e expostas à 30 min de radiação UVB. Decorrido o período de irradiação, os embriões foram analisados em 4 intervalos de tempo: 1 h, 12 h, 24 h e 48 h. Para o grupo controle, foram utilizados embriões de fêmeas não irradiadas em E7 (correspondente aos embriões irradiados e analisados após 1 h e 12 h), E8 (correspondente aos embriões irradiados e analisados após 24 h) e E9 (correspondente aos embriões irradiados e analisados após 48 h).

**Figura 9: Representação esquemática do delineamento experimental detalhando as três etapas desenvolvidas durante o presente trabalho. (\*)** indica o grupo experimental analisado após 12 h de exposição à radiação UVB destinado para as análises de quantificação dos níveis de mtDNA, níveis de transcritos dos genes relacionados à biogênese/fusão/fissão mitocondrial e conteúdo de proteínas relacionadas ao processo de mitofagia.



Obs: Imagens de E1 e E4 correspondem a embriões previamente submetidos à solução fixadora de Bouin; imagem de E3 corresponde a embrião pré-corado com Azul de Toluidina; E5-E14 imagens correspondem ao aspecto natural de embriões não fixados.

Fonte: Da própria autora, 2018.

### 3.4 PROCEDIMENTO DE IRRADIAÇÃO

Fêmeas ovígeras de *M. olfersii* com embriões em E7 foram transferidas para aquário de 30 litros desprovido de abrigos, equipado com lâmpada UVB de 6 W de potência (VilberLourmat) e irradiadas por 30 min. O período de 30 min de exposição à radiação UVB simulou a irradiância natural média de  $310 \text{ mW.cm}^{-2}$  (dose de  $558 \text{ J.cm}^{-2}$ ), similar a qual as fêmeas de *M. olfersii* são expostas durante a estação reprodutiva na Ilha de Santa Catarina, segundo Nazari et al. (2010).

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO *in silico* DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DOS GENES *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* EM EMBRIÕES DE *M. olfersii*

No presente estudo foram selecionados para análise quatro genes conservados que codificam proteínas que atuam no processo de biogênese mitocondrial, como o *Tfam* e o *Nrf1* e nos processos de fusão/fissão mitocondrial, como o *Mfn1* e o *Drp1*. Para a identificação desses genes, sequências aminoacídicas de outras espécies obtidos no GenBank foram utilizadas para a busca de sequências similares no transcriptoma dos embriões de *M. olfersii* (JARAMILLO et al., 2016a), através do algoritmo *tBLASTn* (e-value  $<e^{-5}$ ) (Quadro 1).

**Quadro 1: Sequências aminoacídicas dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* selecionadas do GenBank utilizadas para a busca de sequências similares no transcriptoma dos embriões de *Macrobrachium olfersii*.**

Gene	Sequência selecionada	Genbank
<i>Tfam</i>	<i>Danio rerio</i>	NP_001070857
<i>Nrf1</i>	<i>Mus musculus</i>	AAH05410
<i>Mfn1</i>	<i>Mus musculus</i>	AAH56641
<i>Drp1</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_608694

As sequências nucleotídicas obtidas pela busca nos unigenes do transcriptoma de *M. olfersii* foram traduzidas para a obtenção das sequências aminoacídicas utilizando o *software* ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>).

### 3.6 DESENHO DOS INICIADORES

Os iniciadores específicos para as sequências dos transcritos foram desenhados com base nas sequências identificadas no transcriptoma de



*M. olfersii*, através do software Oligo Explore v1.5 (Gene Link, NY, USA). A ausência de dímeros nos iniciadores foi analisada com o programa Oligo Analyzer v1.5 (Gene Link, NY, USA). O gene *RpL8* (proteína ribossomal L8) foi utilizado como gene de referência. De acordo com Jaramillo et al. (2017), o gene *RpL8* foi recentemente demonstrado ser o melhor gene de referência para ensaios de qPCR com embriões de *M. olfersii* durante o desenvolvimento embrionário. As sequências de iniciadores e o número ótimo de ciclos de PCR para análise da expressão gênica nas células embrionárias estão representados na Tabela 1. A eficiência dos iniciadores foi considerada na faixa de 1,9 a 2,1. Após a identificação dos transcritos dos genes de interesse em *M. olfersii*, foi verificada a amplificação dos genes e a especificidade dos iniciadores através de PCR, a partir de amostras de DNA e cDNA.

**Tabela 1: Sequência de iniciadores dos genes de interesse e tamanho da amplificação de PCR para análises em embriões de *Macrobrachium olfersii*.**  
S: iniciador senso. AS: iniciador antissenso. pb: pares de bases.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplificação
<i>Primers utilizados para análises de expressão gênica (RTqPCR)</i>			
<i>RpL8</i>	GTATGTTGCTGGTGGAGGTC	CTCTACAGGTTTCATCGCTAC	125 pb
<i>Tfam</i>	TGGAGCTGCTACTAGATGG	GGATACGCTTCAGGTCTTC	182 pb
<i>Nrf1</i>	GCAAAAGACAACAGACAAGAC	GGGTAGCAACAACAACAACAG	100 pb
<i>Mfn1</i>	GACCCAAGCAATGAACC	TAGACAACCATAGACTCCAC	182 pb
<i>Drp1</i>	ATGGGCACAATTCCTACAC	CCGCTATTCTCGCAGTTTC	89 pb
<i>Primers utilizados para estimativa do número absoluto de cópias de mtDNA</i>			
<i>COXI</i>	CTGGGGATGGTCTATGCT	TGTCCACGTCTATTCTACT	91 pb
<i>DDX23</i>	GCAACTCCTGGTCTGCTCTC	CCTCAGCATCATCAGTGTC	181 pb

### 3.7 ANÁLISES *in silico*

Sequências nucleotídicas codificantes para os genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* de *M. olfersii* foram utilizadas como sequências de entrada (*query*) para a busca de sequências homólogas de espécies de vertebrados e invertebrados em bancos de dados de sequências não redundantes (nr), EST (*Expressed Sequence Tags*) e TSA (*Transcriptome Shotgun Assembly*) disponíveis no GenBank. As buscas foram realizadas utilizando-se a ferramenta *tBLASTx* para avaliar a similaridade aminoacídica com sequências gênicas descritas. Apenas sequências completas com coeficientes de identidade superiores a 50% e *e-value* inferior a  $10^{-15}$  foram selecionadas. O software ExPasy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) foi utilizado para a obtenção das

sequências aminoacídicas deduzidas. A previsão do local de clivagem do peptídeo sinal foi realizada através do software SignalP 4.1. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e parâmetros bioquímicos como massa molecular (MW) e ponto isoelétrico teórico (pI) do peptídeo maduro foram analisados usando o *software* ExPasy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>). O *software* Conserved Domain Database foi utilizado para a busca de domínios proteicos conservados. Alinhamentos múltiplos foram gerados a partir do algoritmo ClustalW no *software* BioEdit Sequence Alignment Editor® versão 7.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>). Reconstruções filogenética baseadas em sequências de aminoácidos de *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* de diferentes espécies de invertebrados aquáticos e de outros organismos modelos para pesquisas na área de Biologia do Desenvolvimento foram conduzidas através do software MEGA X (KUMAR et al., 2018) utilizando o método estatístico *Neighbor Joining*, com 1.000 replicatas. Sítios contendo gaps entre as sequências foram desconsiderados previamente à reconstrução das árvores.

### 3.8 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração total do RNA dos embriões (n = 3 *pool* de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata) foi realizada utilizando o reagente Brazol (*LGC Biotecnologia*®), de acordo com as instruções do fabricante. Os embriões foram homogeneizados em Brazol e centrifugados (12.000 x g por 10 min a 4°C). Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado (5:1 Brazol/Clorofórmio) e as amostras foram centrifugadas novamente (12.000 g por 15 min a 4°C). O sobrenadante foi coletado e adicionado 500 µL de isopropanol e novamente centrifugado (12.000 x g por 15 min a 4°C). O sedimento (*pellet*) foi lavado com etanol a 75%, centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 4°C e diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 1%. As amostras de RNA purificado foram tratadas com DNase I (1 U/mL, Thermo Scientific®) durante 30 min a 37°C e 10 min a 65°C. Em seguida, 90 µL da amostra foi precipitada utilizando 10 µL de acetato de sódio a 0,3 M (pH 5,2) e isopropanol (1: 1, v: v). Após a centrifugação (12.000 x g por 10 min a 4°C), o sedimento foi lavado com etanol a 75%, secado, e solubilizado em água tratada com DEPC a 1%. A integridade de RNA total foi verificada por eletroforese em géis de agarose a 1,5% corado com GelRed (1:500, Biotium). A eletroforese foi realizada em tampão TAE 0,5 X de corrida (Tris-hidroximetil-

aminometano, ácido acético glacial, ácido etilenodiaminotetracético) a 100 V durante 30 min. O gel foi fotodocumentado em ChemDoc MP (Bio-Rad) (LAMEB/CCB/UFSC). A quantificação do RNA total foi realizada através do Nano espectrofotômetro BIO-5000-BI (KASUAKI) e as amostras com valores de 260/280 e 260/230 > 1,8 foram selecionadas para a síntese do DNA complementar (cDNA).

### 3.9 SÍNTESE DE cDNA

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

### 3.10 RT-PCR SEMIQUANTITATIVA

Para determinar o período de tempo ideal da resposta celular da expressão dos transcritos dos *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* após 3 h, 6 h e 12 h da exposição à radiação UVB, foi realizada a técnica de RT-PCR semiquantitativa. Antes da análise de expressão gênica por RT-PCR semiquantitativa, foi determinado o ciclo apropriado para cada gene, a partir de vários ciclos de PCR (27, 29, 31, 33 ciclos), a fim de verificar se a amplificação estava na fase exponencial, sem atingir o platô. A reação de PCR foi realizada usando o kit *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), com 1 µL de cDNA (diluído 1/10) e iniciadores de 0,3 µM. O PCR foi realizado em um termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad). As condições de PCR foram de 94°C durante 5 min, seguido por 31 ciclos (94°C, 60°C e 72°C, 1 min cada), e uma extensão final de 72°C por 10 min. Um número de 31 ciclos de PCR foi utilizado para todos os genes, com exceção do gene *Rpl8*, para o qual foram utilizados 25 ciclos. A amplificação dos fragmentos de cDNA foram quantificados em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed (Biotium). Após a eletroforese, o gel foi fotografado usando o sistema ChemiDoc MP (LAMEB/CCB/UFSC). A intensidade das bandas do gel foi quantificada pela densitometria usando o software Image J v.1.49 (NIH, USA). O

gene *RpL8* foi usado como um gene de referência para relativizar os níveis de transcritos dos genes. O perfil dos níveis dos transcritos foi criado usando o programa Multiple Array Viewer 4.8.

### 3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

Os níveis de transcritos dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* nos embriões de *M. olfesi* (n = 3 *pool* de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata) foram quantificados utilizando o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) através do equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados foram os mesmos que os da técnica de PCR convencional (Tabela 1). Para cada gene, reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicatas com 2 µL de cDNA diluído (1/10) de cada uma das amostras. Cada reação de qPCR consistiu de 5 µl de GoTaq® Master Mix 2X, 0,3 µM de iniciador, 0,1 µL *CXR Reverse Dye*, 2 uL de cDNA diluído (1/10) e água livre de nuclease em volume total de 10 µL. As condições de qPCR foram as seguintes: desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 seg, anelamento e extensão a 62°C durante 1 min. A eficiência de amplificação para cada gene foi calculada a partir de uma série de diluição (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) de *pools* de cDNA de todas as amostras usando a equação  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  (PFAFFL 2001; 2004). Iniciadores com eficiências de amplificação, na faixa de 1,9 - 2,1 e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) da curva padrão superior a 0,99 foram utilizadas nas análises de RT-qPCR. A especificidade dos iniciadores foi avaliada por análise da curva de *melting* e pela amplificação dos produtos de qPCR avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com GelRed (1:500, Biotium). Os níveis dos transcritos dos genes foram normalizados com o gene *RpL8* e a expressão gênica relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). Para as análises de RT-qPCR, um *cut-off* > 1,5 x foi considerado para determinar diferenças na expressão gênica.

### 3.12 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA MITOCONDRIAL

A extração total do DNA dos embriões (n = 3 *pool* de 25 mg de embriões/grupo experimental/duplicatas) foi realizada utilizando o kit Brasília (*LGC Biotecnologia*) de acordo com o protocolo do fabricante. Os embriões foram homogeneizados com 100 µL de tampão de lise (L1) durante 10 min sob agitação constante, e centrifugada (10.000 x g por 1

min a 4° C). O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspenso em 500 µL do tampão de lavagem (L2) e centrifugado novamente (10.000 x g por 1 min a 4° C). Esta etapa foi repetida novamente para o tampão de lavagem (L2), seguida de dupla repetição para o tampão de lavagem (L3) e (L4), seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. Posteriormente, foi adicionado 50 µL de tampão de diluição ao sedimento seco em termobloco, permanecendo por 10 min a 56°C. As amostras foram centrifugadas (12.000 x g por 10 min a 4°C) e o sobrenadante foi centrifugado novamente (12.000 x g por 1 min a 4° C) para a eliminação da resina. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (BIO-5000-BI, Kazuaki) e as taxas de absorvância (260/280 e 260/230) > 1,8 foram consideradas aceitáveis. Os genes mitocondrial (*COXI*) e nuclear (*DDX23*) foram identificados a partir das sequências de transcriptoma de embriões de *M. olfersii* (JARAMILLO et al., 2016). As reações de qPCR foram realizadas utilizando iniciadores específicos (Tabela 1) e 10 ng de DNA extraído com o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e utilizando o equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (LAMEB/CCB/UFSC). As condições dos ciclos de qPCR e a curva de *melting* foram realizados, conforme mencionado anteriormente (item 3.11), com exceção do volume de amostra (1 µL) de DNA total (10 ng). A quantificação absoluta dos genes foi estimada utilizando uma curva padrão derivada de uma série de diluição de 10 x de plasmídeos contendo as sequências de DNA ( $10^7$  a  $10^3$  plasmídeo/µL;  $R_2 = 0,999$  e  $0,998$  para *COXI* e *DDX23*, respectivamente). Os resultados foram apresentados como a razão de abundância de cópias do gene *COXI / DDX23* por ng de DNA.

### 3.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os embriões (n = 3 embriões/grupo experimental) foram fixados em glutaraldeído a 2,5% + paraformaldeído a 2,5%, diluídos em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M durante 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o cório (envoltório dos ovos) foi permeabilizado utilizando hipoclorito de cálcio a 5% durante 20 min, sob agitação constante, seguido da adição da solução de tiosulfato de sódio por 2 min, a fim de neutralizar a reação anterior. Após permeabilizar o cório, os ovos retornaram para a solução fixadora por mais 24 h. Em seguida, foram pós-fixados por 5 h em solução de tetróxido de ósmio a 1% e 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

min 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 h 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 min e citrato de chumbo a 1% de por 10 min (REYNOLDS, 1963). As análises foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM 1011) (Laboratório Central de Microscopia/UFSC – LCME). Para avaliar o efeito da exposição à radiação sobre as células embrionárias de *M. olfersii*, alterações nucleares e mitocondriais foram quantificadas em um conjunto de dez micrografias eletrônicas aleatórias de embriões de todos os grupos analisados. A intensidade e a frequência do dano encontrado para cada componente subcelular foram analisadas sem conhecer a atribuição do tratamento. O score de ++++ (severa) foi atribuído para classificar a alteração mais intensa e frequente encontrada nas imagens observadas. Outros scores foram atribuídos como +++ (intensa), ++ (moderada), + (leve) e – (ausente), de acordo com a alteração observada.

### 3.14 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A avaliação da produção de ERO dos embriões ( $n = 3$  pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata) foi realizada utilizando o método quantitativo de 2',7'-Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA). Os embriões foram homogeneizados por trituração com PBS 10 mM + Tween-20®, seguido de dissociação das células com 0,25% de tripsina por 15 min. Posteriormente, as células foram lavadas com SFB a 10% por 45 min e centrifugadas a 640 x g por 10 min. A fração intermediária foi recentrifugada por 640 x g por 10 min e as células foram incubadas com DCFH-DA (10 µM) por 30 min a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 10 mM e coletadas para a determinação da produção de ERO no Citômetro de Fluxo FACSCanto II (BD Bioscience) (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB/CCB/UFSC). A análise das marcações celulares foram realizadas no programa Flowing *Software* 2.

### 3.15 CITOMETRIA DE FLUXO

Os embriões ( $n = 3$  pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata) foram fixados em solução de paraformaldeído a 1% por 18 h a 4°C. Após a fixação, os mesmos foram submetidos a três banhos consecutivos de PBS 1 M, pH 7,4. Em seguida, foram homogeneizados por trituração com PBS e Tween-20®, e as células dissociadas com tripsina por 15 min a temperatura ambiente. 100 µL de BSA a 10% foram adicionados às amostras, as quais permaneceram em agitação por 45 min e posteriormente, centrifugadas a 640 x g por 20 min. Após a centrifugação, somente o sobrenadante foi utilizado. Amostras de células foram separadas em alíquotas de 1 mL contendo aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 2) por 1 h, seguido da incubação com anticorpo secundário por 45 min à 4° C ao abrigo de luz. A análise das marcações celulares foi realizada no Citômetro de Fluxo FACSCanto II (LAMEB/CCB/UFSC) e as análises dos dados no programa Flowing Software 2.

**Quadro 2: Anticorpos primários e secundários utilizados nas análises por citometria de fluxo.**

Anticorpos primários				
Anticorpo	Espécies		Isotipo	Diluição
	Origem	Desenvolvida		
Anti-PRK8	Humana	Camundongo	IgG2b	1:1000
Anti-LC3II	Humana	Coelho	IgG	1:1000
Anti-p62	Humana	Camundongo	IgG1	1:1000
Anticorpos secundários				
Anticorpo	Espécie de Origem		Isotipo	Diluição
Anti-camundongo Alexa-fluor® 488	Cabra		IgG2b	1:2000
Anti-coelho Alexa-fluor® 488	Cabra		IgG	1:2000
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	Cabra		IgG1	1:2000

### 3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram analisados no programa Statistica® versão 13.0 para Windows. Os dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a existência de

diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais, foi utilizado o teste de análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, e o teste t de Student para amostras independentes. Diferenças entre os grupos foram considerados significativas quando  $p \leq 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

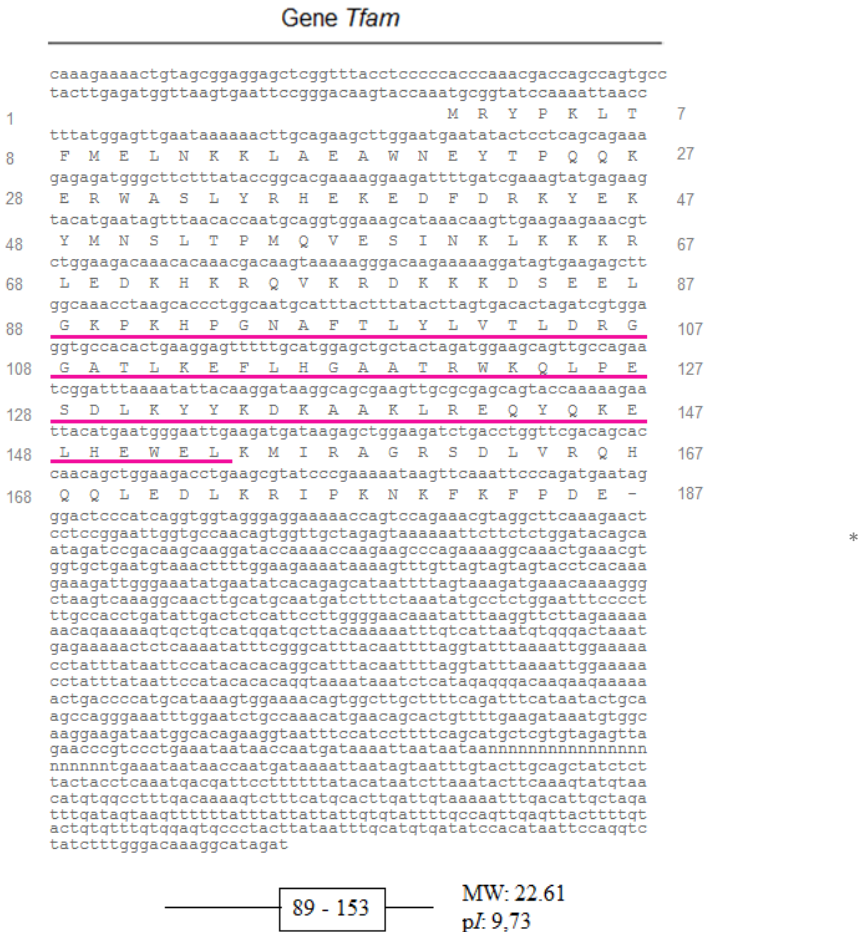
Os resultados obtidos neste trabalho demonstram os efeitos da exposição à radiação UVB sobre as células embrionárias de *M. olfersii*, os quais foram organizados e apresentados na seguinte sequência: (i) análise *in silico* para a identificação dos transcritos relacionados à biogênese/fusão/fissão mitocondrial; (ii) quantificação do nível dos transcritos identificados e do número de cópias do mtDNA durante ao desenvolvimento embrionário; (iii) análise do efeito da radiação UVB sobre a integridade da ultraestrutura e produção de ERO das células embrionárias de *M. olfersii*; (iv) quantificação do nível dos transcritos identificados e do número de cópias do mtDNA em resposta a exposição à radiação UVB; (v) análise do efeito da radiação UVB sobre o conteúdo de proteínas envolvidas com o processo de mitofagia.

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS TRANSCRITOS DOS GENES RELACIONADOS À BIOGÊNESE/FUSÃO/FISSÃO MITOCONDRIAL

A partir do transcriptoma de embriões de *M. olfersii*, foram identificadas as sequências nucleotídicas dos genes de *Tfam*, *Nrf1*, potencialmente associados ao processo de biogênese mitocondrial, e *Mfn1* e *Drp1*, potencialmente associados aos processos de fusão/fissão mitocondrial.

A sequência de mRNA do gene *Tfam* de *M. olfersii* apresentou-se completa e inicia-se com uma região não traduzida (5'-UTR) contendo 101 pares de bases (pb), seguido de 561 pb na sequência codificante (CDS) e finalizando com 1.182 pb na região não traduzida 3'-UTR (Figura 10). A CDS codifica um peptídeo de 186 aminoácidos, o qual apresenta um domínio proteico pertencente a grande família das NHP6B encontrado no intervalo de 4 -150 (e-value 4.86e-04). O domínio de alta mobilidade (HMG, do inglês *high mobility group box*) presente no intervalo de 89 – 153 (e-value 5,01e<sup>-04</sup>) está envolvido em processos de ligação ao DNA e na interação proteína-proteína, sendo caracterizados por formarem uma grande família relacionada com a transcrição, replicação, reparo e regulação da expressão gênica (Figura 17). Além disso, a sequência aminoacídica de *Tfam* apresentou um peptídeo maduro catiônico (pI: 9,73), semelhante quando comparado ao pI de outras espécies, com uma massa molecular média de 22,61 kDa (Tabela 2).

**Figura 10: Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de *Tfam* de *Macrobrachium olfersii*. A linha colorida indica a região aminoacídica onde está localizado o domínio proteico. (\*) marca o códon de parada.**

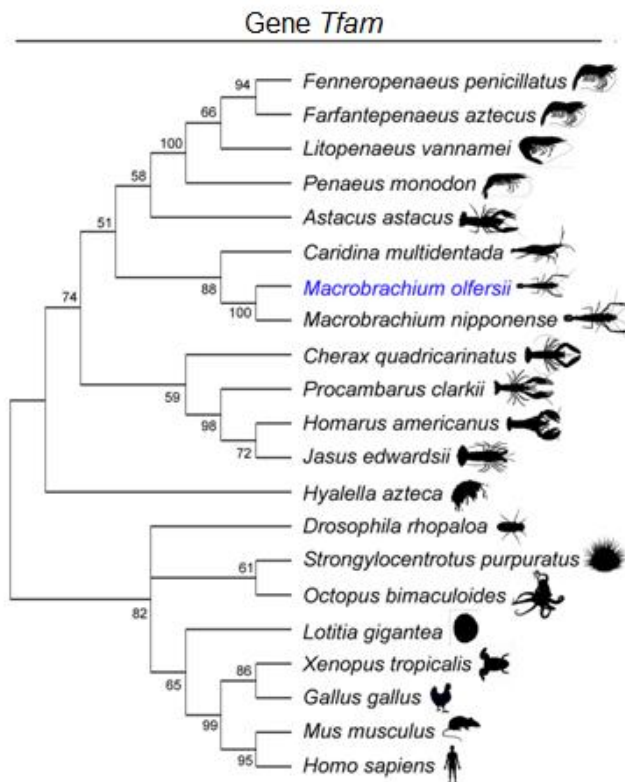


Fonte: Da própria autora (2018).

A sequência aminoacídica deduzida de *Tfam* foi comparada através de uma reconstrução filogenética com 20 diferentes sequências de espécies de invertebrados aquáticos e outros organismos modelos em

biologia do desenvolvimento encontrados no banco de dados Nucleotide collection (nr/nt) e no Transcriptome Shotgun Assembly (TSA). De acordo com a análise do cladograma resultante do alinhamento aminoacídico, a sequência de *Tfam* de *M. olfersii* agrupou-se no mesmo grande clado dos crustáceos, apresentando 85% de identidade com a espécie de camarão *Macrobrachium nipponense* (GenBank GCVG01032640) (Figura 11).

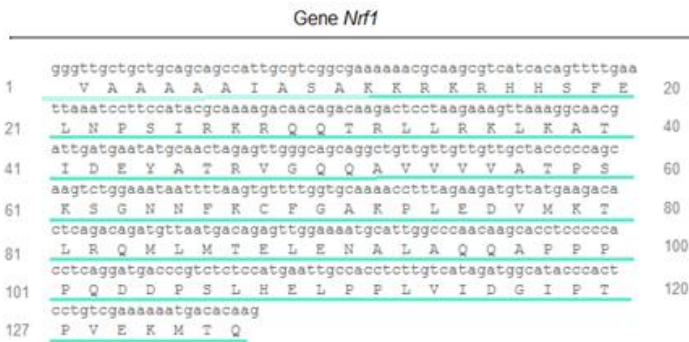
**Figura 11: Cladograma resultante do alinhamento aminoacídico do gene *Tfam*.** As sequências foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW previamente à elaboração do cladograma. O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor Joining (1.000 replicatas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós da árvore. Os números de acesso das sequências selecionadas no GenBank encontram-se na Tabela 2. Imagens ilustrativas representam os organismos analisados.



**Fonte:** Da própria autora (2018).

A sequência de mRNA do gene *Nrf1* apresentou-se incompleta contendo 364 pb de CDS a qual codifica um peptídeo 127 aminoácidos (Figura 12). O domínio proteico pertencente a grande família das DNA-bind está localizado no intervalo de 1 – 127 (e-value  $3e-58$ ) e é conhecido por ser um ativador da atividade transcricional (Figura 17). Por apresentar-se incompleta, a reconstrução filogenética e as características bioquímicas não foram analisadas para a sequência aminoacídica de *Nrf1*.

**Figura 12: Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de *Nrf1* de *Macrobrachium olfersii*.** A linha colorida indica a região aminoacídica onde está localizado o domínio proteico.



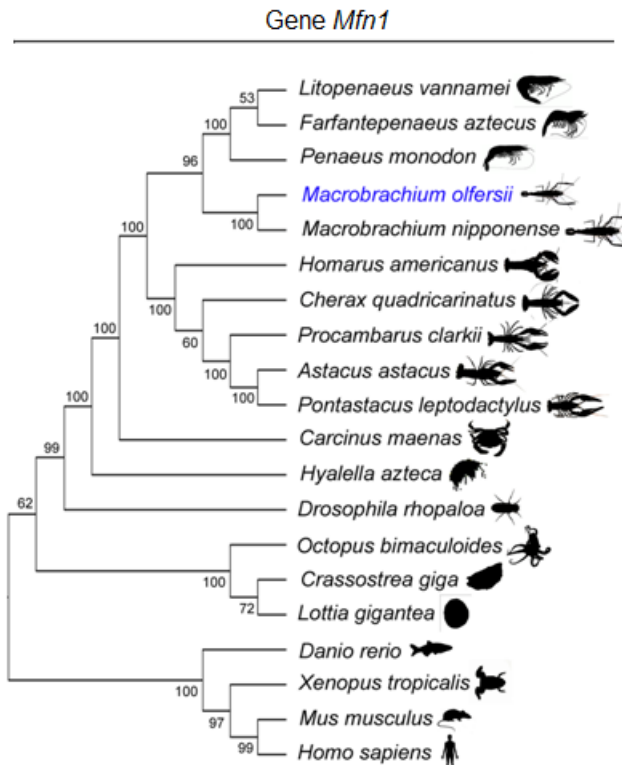
**Fonte:** Da própria autora (2018).

Para o gene *Mfn1*, a sequência de mRNA apresentou-se completa com 306 pb na região 5'UTR, seguindo com 1980 pb na região CDS e finalizando com 5073 pb na região 3'UTR (Figura 13). O peptídeo apresentou dois domínios conservados, o DLP\_2 pertencente à família das dinaminas, que se encontra no intervalo de 3 - 162 (e-value  $3.5e^{-22}$ ) seguido do domínio Fzo\_mitofusin no intervalo de 496 – 656 ( $5.2e^{-66}$ ), sendo considerada uma região altamente conservada e mediadora da fusão mitocondrial (Figura 17). A sequência aminoacídica de *Mfn1* apresentou um peptídeo maduro aniônico ( $pI$ : 6,85) com uma massa molecular média calculada de 75,28 kDa (Tabela 3).



A reconstrução filogenética revelou que as sequências aminoacídicas deduzidas de *Mfn1* agruparam-se em um clado juntamente com diferentes espécies de crustáceos, compartilhando uma alta identidade aminoacídica de 93% com o camarão *Macrobrachium nipponense* (GCVG01026402.1) (Figura 14).

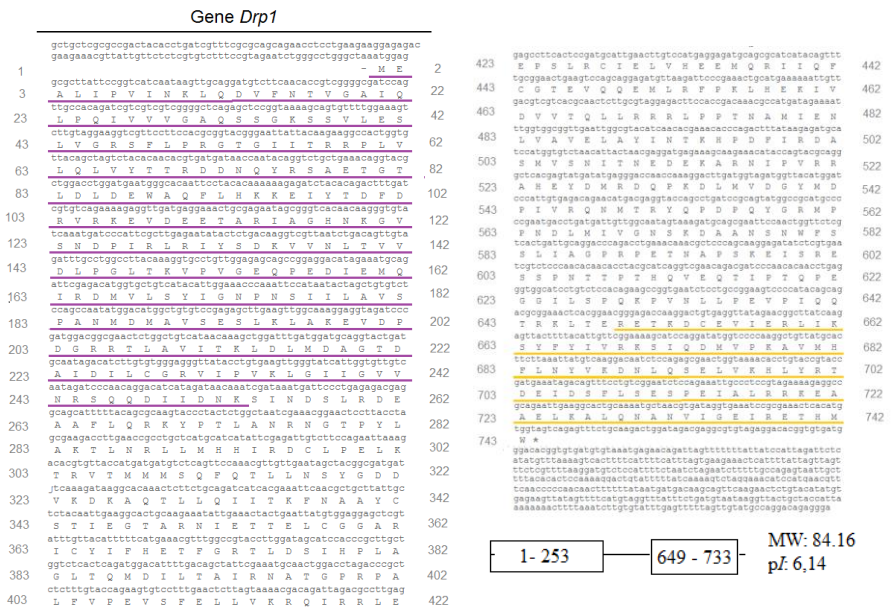
**Figura 14: Cladograma resultante do alinhamento aminoacídico do gene *Mfn1*.** Foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW previamente à elaboração do cladograma. O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor Joining (1.000 replicatas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós da árvore. Os números de acesso das sequências selecionadas no GenBank encontram-se na Tabela 3. Imagens ilustrativas representam os organismos analisados.



**Fonte:** Da própria autora (2018).

A sequência de nucleotídeos de mRNA do gene *Drp1* apresentou-se completa e tem início com a região 5'UTR apresentando 116 pb, seguido da CDS contendo 2.232 pb e finalizando com a região 3'-UTR com 457 pb (Figura 15). A CDS codifica um peptídeo de 173 aminoácidos. Esta sequência apresenta o grande domínio da GTPase situado no início da sequência no intervalo entre 1 – 253 (e-value 9.41e-112) seguido do domínio efetor da GTPase (GED) no intervalo de 649 – 737 (e-value 3.16e-28), o qual está envolvido na oligomerização e regulação da atividade da GTPase (Figura 17). A sequência aminoacídica de *Drp1* apresentou um peptídeo maduro aniônico (pI: 6,14) com uma massa molecular média calculada em 84,16 kDa (Tabela 3).

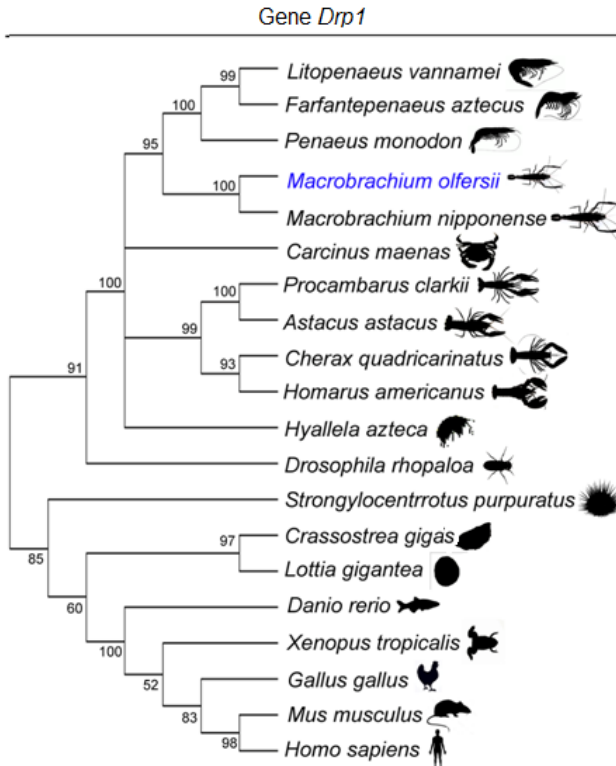
**Figura 15: Sequência de nucleotídeos (letras minúsculas) e de aminoácidos deduzidos (letras maiúsculas) de *Drp1* de *Macrobrachium olfersii*. A linha colorida indica a região aminoacídica onde está localizado o domínio proteico. (\*) marca o códon de parada.**



A sequência aminoacídica deduzida de *Drp1* foi comparada com 19 diferentes sequências de outras espécies e a reconstrução filogenética revelou o agrupamento com o grande clado composto por espécies de crustáceos. Observou-se 99% de identidade aminoacídica,

quando comparada com a sequência do camarão *Macrobrachium nipponense* (GCVG01002110) (Figura 16).

**Figura 16: Cladograma resultante do alinhamento aminoacídico do gene *Drp1*.** Foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW previamente à elaboração do cladograma. O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor Joining (1.000 replicatas) no programa MEGA X. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós da árvore. Os números de acesso das sequências selecionadas no GenBank encontram-se na Tabela 3. Imagens ilustrativas representam os organismos analisados.



Fonte: Da própria autora (2018).

As reconstruções filogenéticas das sequências aminoacídicas dos genes analisados apresentaram o mesmo padrão, mantendo-se agrupadas no grande clado das espécies de crustáceos selecionadas. Já as sequências aminoacídicas de outras espécies de invertebrados, assim como de modelos de modelos em biologia do desenvolvimento



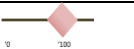
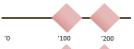
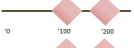
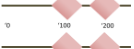

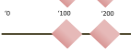
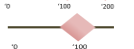
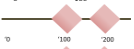
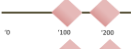


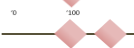
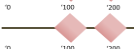
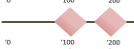
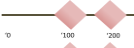



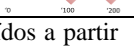
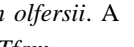
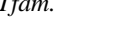
agruparam-se no clado irmão das espécies de crustáceos, mostrando homologia entre as sequências analisadas.


**Figura 17: Domínios proteicos de *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1*.** Resultado do programa *Converged Domain Database* ilustrando a presença de domínios conservados nas sequências aminoacídicas resgatadas.



Fonte: Da própria autora (2018).

**Tabela 2: Parâmetros bioquímicos dos genes *Tfam* de diferentes espécies de invertebrados e vertebrados.**






Gene	Espécie	GenBank	Peptídeo maduro			Domínio proteico
			aa	MW	pI	
<i>Tfam</i>	<i>M. olfersii</i>		186	22.61	9.73	
	<i>M. nipponense</i>	GCVG01032640	252	30.06	9.88	
	<i>C. multidentata</i>	IABX01130386	252	30.13	9.99	
	<i>H. americanus</i>	GFDA01093487	250	29.31	9.87	
	<i>P. clarkii</i>	GARH0129160	248	28.90	9.61	
	<i>C. quadricarinatus</i>	HACK01021728	250	29.48	9.72	
	<i>J. edwardsii</i>	GGHM01065307	252	29.94	10.01	
	<i>A. astacus</i>	GEDF01017741	141	16.85	9.52	
	<i>L. vannamei</i>	JP362783	251	29.64	9.93	
	<i>P. monodon</i>	GEME01065098	251	29.69	9.86	
	<i>F. aztecus</i>	GEUA01068738	251	29.67	9.91	
	<i>F. penicillatus</i>	GFRT01007565	251	29.82	9.88	
	<i>H. azteca</i>	XM_018172149	154	18.39	9.59	
	<i>D. rhopaloa</i>	XM_017126007	257	29.94	10.01	
	<i>S. purpuratus</i>	XM_003727033	238	28.15	8.79	
	<i>O. bimaculoides</i>	XM_014920696	277	32.31	10.37	
	<i>L. gigantea</i>	XM_009046427	232	26.97	9.74	
	<i>X. tropicalis</i>	XM_002937102	281	32.64	10.17	
	<i>G. gallus</i>	XM_015287951	254	29.29	10.17	
	<i>M. musculus</i>	U63858	215	25.03	9.66	
<i>H. sapiens</i>	CR407653	246	29.08	9.74		

Representação esquemática dos domínios determinados e reconstruídos a partir da sequência de *Tfam* identificada em embriões de *Macrobrachium olfersii*. A figura  representa a presença do domínio HMG na sequência de *Tfam*.

**Tabela 3: Parâmetros bioquímicos dos genes *Mfn1* e *Drp1* de diferentes espécies de invertebrados e vertebrados.**

Gene	Espécie	GenBank	Peptídeo maduro			Domínio proteico
			aa	MW	pI	
<b><i>Mfn1</i></b>	<i>M. olfersii</i>		659	75.28	6.85	
	<i>M. nipponense</i>	GCVG01026402	783	88.46	6.67	
	<i>H. americanus</i>	GFUC01085659	786	88.50	6.46	
	<i>P. clarkii</i>	GBEV01003194	785	88.29	6.46	
	<i>C. quadricarinatus</i>	HACB02045816	786	88.63	6.36	
	<i>P. leptodactylus</i>	GBEI01012105	780	87.92	6.55	
	<i>A. astacus</i>	GEDF01015479	780	87.85	6.55	
	<i>L. vannamei</i>	GETZ01032713	783	88.55	6.11	
	<i>P. monodon</i>	JR228098	783	88.45	6.11	
	<i>F. aztecus</i>	GEUA01036924	783	88.49	6.17	
	<i>C. maenas</i>	GBXE01100348	701	78.77	7.08	
	<i>H. azteca</i>	XM_018168475	776	86.82	6.45	
	<i>D. rhopaloa</i>	XM_017131504	807	91.07	6.33	
	<i>S. purpuratus</i>	XM_789819	742	84.23	6.18	
	<i>C. gigas</i>	XM_011450871	751	85.63	7.22	
	<i>L. gigantea</i>	XM_009066731	731	81.08	6.30	
	<i>O. bimaculoides</i>	XM_014932082	748	85.30	6.50	
	<i>X. tropicalis</i>	BC171005	756	86.20	5.8	
	<i>D. rerio</i>	NM_001128254	757	85.94	5.83	
	<i>M. musculus</i>	NM_001355590	757	86.18	6.32	
<i>H. sapiens</i>	NM_001127660.1	757	86.40	6.52		
<b><i>Drp1</i></b>	<i>M. olfersii</i>		743	84.16	6.14	
	<i>M. nipponense</i>	GCVG01002110	748	84.75	5.90	
	<i>H. americanus</i>	GFDA01089116	724	81.75	6.24	
	<i>P. clarkii</i>	GBEV01008000	597	67.27	6.75	
	<i>C. quadricarinatus</i>	KP782024	869	86.72	6.45	
	<i>A. astacus</i>	GEDF01013364	814	92.43	6.48	
	<i>L. vannamei</i>	GETZ01049900	783	87.93	6.22	
	<i>P. monodon</i>	GEME01086043	580	65.34	6.01	
	<i>F. aztecus</i>	GEUA01064043	773	86.64	6.01	
	<i>C. maenas</i>	GBXE01050949	752	85.03	6.12	
	<i>H. azteca</i>	XM_018167265	820	91.55	6.50	
	<i>D. rhopaloa</i>	XM_017134455	727	81.91	6.47	

<i>S. purpuratus</i>	XM_011671864	718	80.47	6.27	
<i>C. gigas</i>	XM_011429781	688	77.65	6.49	
<i>L. gigantea</i>	XM_009068722	624	70.45	6.47	
<i>O. bimaculoide</i>	XM_014912370	838	95.07	7.66	
<i>X. tropicalis</i>	XM_002942290	695	77.74	6.48	
<i>G. gallus</i>	NM_001079722	696	77.74	6.17	
<i>D. rerio</i>	NM_200922	691	77.26	6.16	
<i>M. musculus</i>	BC079635	699	78.01	6.36	
<i>H. sapiens</i>	BC024590.1	710	79.44	6.48	

Representação esquemática dos domínios determinados e reconstruídos a partir das sequências de *Mfn1* e *Drp1* identificadas em embriões de *Macrobrachium olfersii*. Cada figura geométrica com cores diferentes representa a presença de um domínio encontrado na sequência codificante específica. As figuras  e  representam a presença dos domínios DLP\_2 e Fzo\_mitofuzin, respectivamente, encontrados na sequência de *Mfn1*. As figuras  e  indicam a presença dos domínios Dynamin, GTPase e Dynamin GTPase, respectivamente, encontrados na sequência de *Drp1*. A presença do domínio Pleckstri representado pela figura  foi encontrado somente na sequência de *O. bimaculoide*.

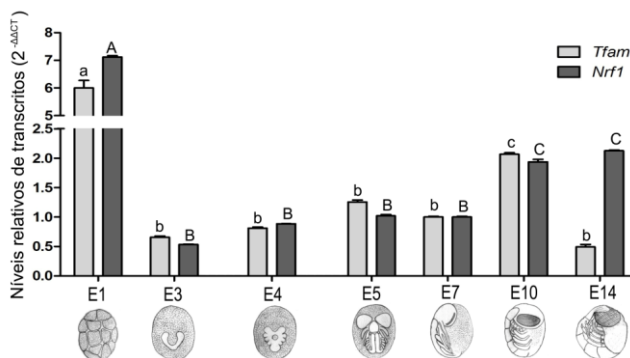
#### 4.2 ANÁLISE DOS PADRÕES DE EXPRESSÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DOS GENES *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *M. olfersii*

A partir de análises de RT-qPCR, o perfil de expressão gênica de *Tfam* e *Nrf1*, envolvidos com o processo de biogênese mitocondrial, bem como dos genes *Mfn1* e *Drp1*, envolvidos com o processo de fusão/fissão mitocondrial, foram analisados durante o desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*.

Os embriões em E1 apresentaram uma maior expressão nos níveis dos transcritos para todos os genes analisados, quando comparados com os dias embrionários subsequentes. Para o gene *Tfam*, o nível dos transcritos em E1 mostrou-se 39,15x maior quando comparados com E3 ( $P < 0,0001$ ). Em seguida, os níveis dos transcritos foram cerca de 3,2x maior em E10 quando comparados com os dias embrionários anteriores ( $P < 0,0001$ ). Em embriões em E14, os níveis de transcritos do gene *Tfam* foi 3,76x menor quando comparados com embriões em E10 ( $P < 0,0001$ ). Para gene *Nrf1*, embriões em E1 apresentaram níveis de transcritos 56x maior, quando comparados com

os embriões em E3 ( $P < 0,0001$ ). Os embriões em E10 e E14, os níveis de transcritos foram aproximadamente 3,6x maior em comparação com os dias embrionários anteriores ( $P > 0,001$ ) (Figura 18).

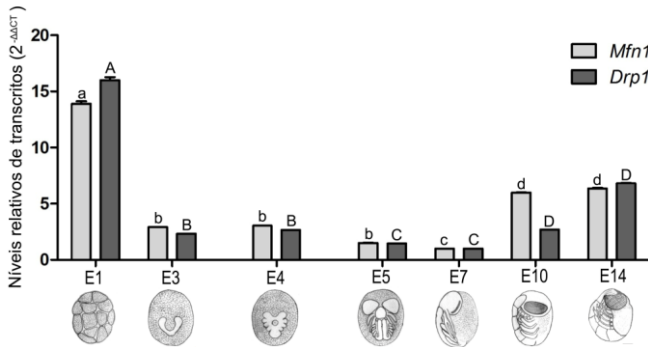
**Figura 18: Níveis de transcritos dos genes *Tfam* e *Nrf1* durante o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersii* analisados por RT-qPCR.** Os níveis de transcritos foram normalizados o gene *Rpl8* e calculados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Letras diferentes indicam diferença significativa de  $P < 0,05$  entre os grupos. Os níveis de expressão relativa foram indicados em média  $\pm$  desvio padrão da média. (n = 3 pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata).



**Fonte:** Da própria autora (2018).

Em relação ao gene *Mfn1*, embriões em E1 apresentaram os níveis de transcritos cerca de 2,9x maior quando comparados com os dias embrionários até E5 ( $P < 0,001$ ). Em seguida, uma redução de 1,96x dos níveis dos transcritos foi observada em E7 ( $P > 0,05$ ). Subsequentemente, os níveis de transcritos de *Mfn1* em E10 e E14 foram cerca de 6,1x maior quando comparados com E7 ( $P < 0,0001$ ). Semelhante para gene *Drp1*, embriões em E1 apresentaram os níveis de transcritos aproximadamente 2,8x maior quando comparados com os dias embrionários até E7 ( $P < 0,001$ ). Em embriões em E10 e E14, os níveis de transcritos do gene *Drp1* foi 2,69x e 6,81x maiores, respectivamente, quando comparados com E7 ( $P < 0,1$ ;  $P < 0,001$ , respectivamente) (Figura 19).

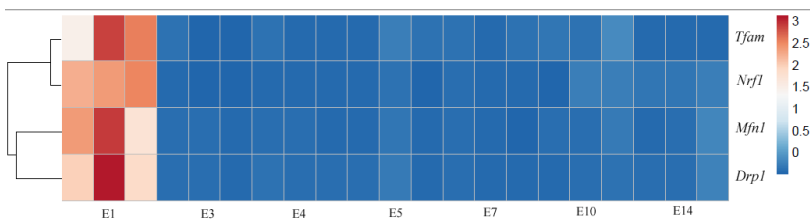
**Figura 19:** Níveis de transcritos dos genes *Mfn1* e *Drp1* durante o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersii* analisados por RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados com o gene *Rpl8* e calculados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Letras diferentes indicam diferença significativa de  $p < 0,05$  entre os grupos. Os níveis de expressão relativa foram indicados em média  $\pm$  desvio padrão da média. (n = 3 pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata).



**Fonte:** Da própria autora (2018).

A relação da expressão dos quatro genes em função dos dias embrionários analisados foi calculada. O mapa de calor (*heatmap*) revelou um perfil de expressão semelhante entre os genes relacionados à biogênese mitocondrial (*Tfam* e *Nrf1*), do mesmo modo que os genes de fusão/fissão mitocondrial (*Mfn1* e *Drp1*), os quais foram organizados em dois clados (Figura 20).

**Figura 20:** Mapa de calor (*heatmap*) da clusterização da expressão dos níveis de transcritos dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* durante os dias embrionários de *Macrobrachium olfersii*. Para cada dia embrionário foram analisadas 3 repetições.

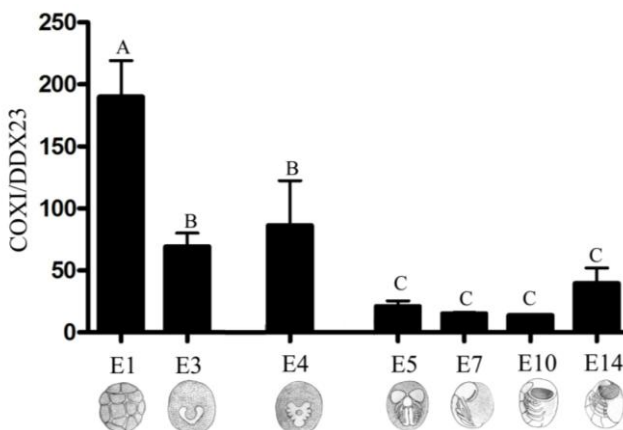


**Fonte:** Da própria autora (2018).

#### 4.3 ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *M. olfersii*

Durante o desenvolvimento embrionário, número de cópias do mtDNA foi 2,73x maior em embriões em E1 quando comparados com E3. Posteriormente, embriões em E4 mostraram o número de cópias 1,7x maior que E5. Durante os dias embrionários de E5 à E14, não foram observadas diferenças entre o número de cópias do mtDNA (Figura 21).

**Figura 21:** Perfis de cópias de mtDNA, gDNA e relação de mtDNA/gDNA durante o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersii*. Letras diferentes indicam diferenças significativas de  $P < 0,05$  entre os dias embrionários. Os resultados do número de cópias e a relação de mtDNA/gDNA foram indicadas em média  $\pm$  desvio padrão da média. ( $n = 3$  pool de 25 mg de embriões/grupo experimental/duplicatas).



**Fonte:** Da própria autora (2018).

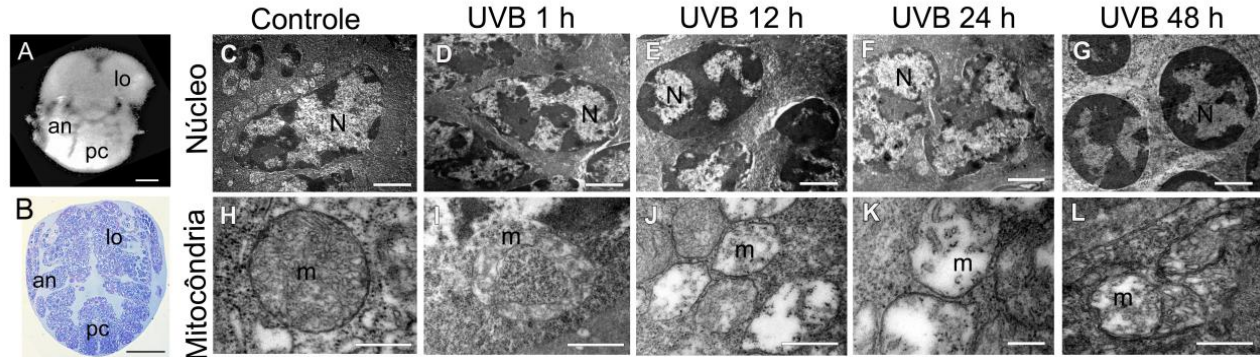
#### 4.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB SOBRE A ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *M. olfersii*

Os embriões E7 são compostos por poucas camadas celulares e apresentam um crescimento superficial ao longo do eixo ântero-

posterior do ovo. Em uma visão dorsal do embrião, é possível observar os lobos ópticos na região cefálica, os apêndices naupliares e pós-naupliares na região mediana e a papila caudal na região caudal do embrião (Figura 22 A, B). Ao avaliarmos a ultraestrutura das células embrionárias de embriões controles, observou-se a presença de um grande núcleo com a predominância de regiões formada por eucromatina elétron-lúcida bem distribuída e heterocromatina elétron-densa localizada adjacente ao envelope nuclear. O citoplasma apresentou-se de forma bem reduzido com grande quantidade de ribossomos livres e mitocôndrias localizadas próximas à membrana nuclear. Não se observou alterações na ultraestrutura nuclear após 1 h de exposição à radiação UVB. A resposta nuclear mais evidente foi à presença de intensa compactação da cromatina, a qual foi observada após 12 h e 48 h. Dentre as alterações nucleares, destaca-se a dilatação do espaço perinuclear após 12 h e 24 h de exposição à radiação UVB. No citoplasma das células embrionárias, o maior efeito reconhecido pela exposição à radiação UVB foi constatado na mitocôndria. Após 1 h, observou-se a formação de mitocôndrias com alterações estruturais e formas circulares anômalas. Subsequentemente, após 12 h, uma severa redução das cristas mitocondriais associada com intensa disrupção das membranas mitocondriais foram observadas. Após 24 h de exposição à radiação UVB, foram observadas mitocôndrias com morfologia compatível com fissão mitocondrial, disrupção das membranas mitocondriais, redução das cristas mitocondriais e mitocôndrias em formato circular. A maior alteração encontrada após 48 h de exposição à radiação UVB foi a disrupção de ambas as membranas mitocondriais interna e externa, acompanhada pela redução das cristas mitocondriais, morfologia compatível à fissão mitocondrial (cerca de 30%) e mitocôndrias em formato circular (Figura 22 I – L, Tabela 4).



**Figura 22: Efeito da radiação UVB sobre a ultraestrutura das células embrionárias de *Macrobrachium olfersii* analisada por microscopia eletrônica de transmissão.** Preparado total do embrião de *M. olfersii* em E7 (A) e vista dorsal da secção semi-fina do embrião em E7 (B), mostrando as mesmas estruturas embrionárias visualizadas em A. Micrografia eletrônica do núcleo mostrando o arranjo característico da cromatina e citoplasma das células de embriões controles (C). Após 1 h da exposição à radiação UVB, não foram observadas mudanças no núcleo (D); compactação da cromatina acompanhada da dilatação do espaço perinuclear foi observada após 12 h, 24 h e 48 h da exposição (E – G). Micrografia eletrônica das mitocôndrias mostraram membranas e cristas preservadas em embriões controles (H). Embriões expostos à radiação mostraram mitocôndrias com formato circular após 1 h de exposição (I). Redução das cristas mitocondriais e a quebra das membranas mitocondriais foram observadas após 12 h, 24 h e 48 h, respectivamente (J – L). Abreviaturas: pc, papila caudal; m, mitocôndria; N, núcleo; an, apêndices naupliares; lo, lobo óptico. Barra de escala em A = 35  $\mu\text{m}$ ; B = 50  $\mu\text{m}$ ; C – G= 2  $\mu\text{m}$ ; H – L = 0,5  $\mu\text{m}$ . (n = 3 embriões/grupo experimental).



**Fonte:** Da própria autora (2018).

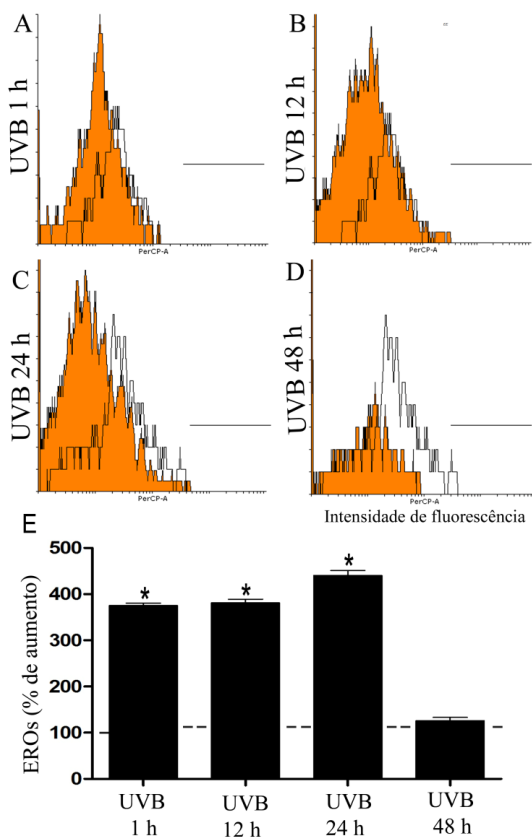
**Tabela 4: Intensidade de alterações nucleares e mitocondriais das células embrionárias de *Macrobrachium olfersii*.** Alterações ultraestruturais classificadas com escores como - (ausente), + (leve), ++ (moderada), +++ (intensa) e ++++ (severa).

Compartimentos celulares	Alterações ultraestruturais	Controle	Time-points			
			1 h	12 h	24 h	48 h
Núcleo	Compactação da cromatina	-	+	+++	+++	+++
	Dilatação do espaço perinuclear	-	+	+++	++	+
Mitocôndria	Mitocôndria circular	-	++++	++	+	+
	Redução das cristas mitocondriais	-	+	++++	+++	+++
	Morfologia compatível com fissão mitocondrial	-	-	+	++++	++
	Disrupção das membranas mitocondriais internas e externas	-	+	+++	++++	++++

#### 4.5 EFEITO DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB SOBRE A PRODUÇÃO DE ERO DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE *M. olfersii*

As células embrionárias aumentaram significativamente a quantidade de ERO após 1 h de exposição à radiação UVB. Esse aumento de ERO intracelular foi mantido durante 12 h e 24 h após a exposição à radiação UVB, havendo um decréscimo significativo, quando analisado após 48 h de exposição. A concentração de ERO encontrada em 48 h após a exposição à radiação não diferiu quando comparada com células embrionárias de embriões controles (Figura 23).

**Figura 23: Efeito da radiação UVB sobre a produção de ERO nas células embrionárias de *Macrobrachium olfersii* quantificada por citometria de fluxo.** Gráficos representam a expressão do perfil de células DCFH-DA-positivas por citometria de fluxo (A – D). Gráfico (E) mostra o aumento da produção de ERO após 1 h, 12 h e 24 h de exposição à radiação UVB. As barras representam a média ( $\pm$  EPM) de três experimentos independentes. Os asteriscos (\*) indicam diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) entre os grupos. A linha tracejada indica a porcentagem da produção de ERO nos embriões controles. (n = 3 pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata).

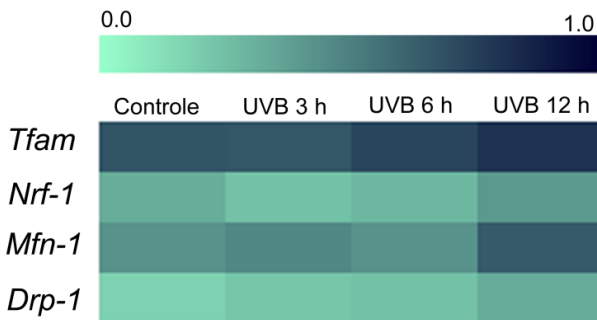


**Fonte:** Da própria autora (2018).

#### 4.6 EFEITO DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB SOBRE O PERFIL TEMPORAL DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DOS GENES *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* E *Drp1*

Posterior às análises dos níveis dos transcritos ao longo do desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*, o perfil temporal dos transcritos foi avaliado em embriões em E7 após 3 h, 6 h e 12 h da exposição à radiação UVB. Os níveis dos transcritos envolvidos com a biogênese mitocondrial (*Tfam* e *Nrf1*) e na fusão/fissão mitocondrial (*Mfn1* e *Drp1*) mostraram um aumento gradual, de caráter tempo-dependente da exposição à radiação UVB (Figura 24). Com base nesta análise, o tempo de 12 h após a exposição à radiação UVB foi escolhido para as análises quantitativas subsequentes. Essa escolha justifica-se pelo fato de após 12 h apresentar maior intensidade na expressão dos transcritos, o que demonstra o tempo necessário para o recrutamento da maquinaria celular e a visualização das respostas celulares frente ao insulto.

**Figura 24: Análise por MeV da expressão dos níveis dos transcritos dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* em embriões (E7) de *Macrobrachium olfersii* analisados após 3 h, 6 h e 12 h da exposição à radiação UVB por RT-PCR semi-quantitativa.** Níveis de transcritos dos genes normalizados para o gene *Rpl8*. Cada retângulo da matriz indica o valor de expressão do gene em um determinado grupo (3 *pools* de cDNA/grupo). A magnitude dos níveis de transcrito é indicada pela escala da cor azul (fraco a forte) construída através do programa Multiple Array Viewer 48.

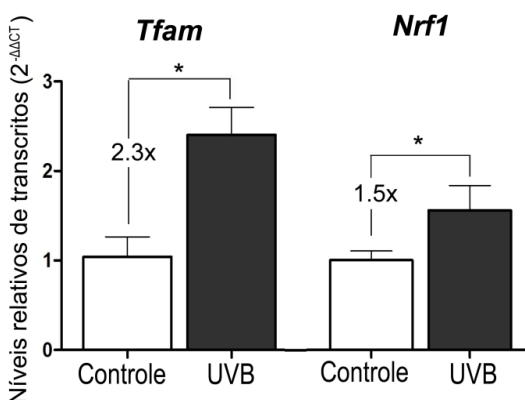


**Fonte:** Da própria autora (2018).

#### 4.7 NÍVEIS DE TRANSCRITOS DOS GENES *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* E *Drp1* APÓS 12 H DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB

Os níveis dos transcritos dos genes *Tfam* e *Nrf1* apresentaram-se 2,3x e 1,55x maiores, respectivamente ( $P < 0,001$ ), após 12 h de exposição à radiação UVB em comparação aos embriões não irradiados (Figura 25).

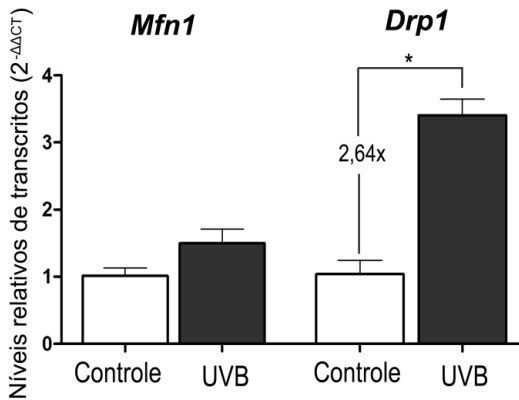
**Figura 25:** Níveis de transcritos dos genes *Tfam* e *Nrf1* em embriões (E7) de *Macrobrachium olfersii* analisados após 12 h de exposição à radiação UVB por RT-qPCR. Os níveis de transcritos foram normalizados com o gene *Rpl8* e calculados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . (\*) indica diferença significativa de  $P < 0,05$  entre os grupos. Os níveis relativos de transcrição foram indicados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (n = 3 pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata).



**Fonte:** Da própria autora (2018).

Os níveis de transcritos de *Mfn1* não diferiram entre os grupos analisados. No entanto, os níveis de transcritos do gene de *Drp1* apresentaram-se 2,64x maiores ( $P < 0,01$ ) em embriões expostos à radiação UVB, quando comparados com embriões não irradiados (Figura 26).

**Figura 26: Níveis de transcritos dos genes *Mfn1* e *Drp1* em embriões (E7) de *Macrobrachium olfersii* analisados após 12 h de exposição à radiação UVB por RT-qPCR.** Os níveis de transcritos foram normalizados o gene *Rpl8* e calculados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . (\*) indica diferença significativa de  $P < 0,05$  entre os grupos. Os níveis relativos de transcrição foram indicados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (n = 3 *pool* de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata).

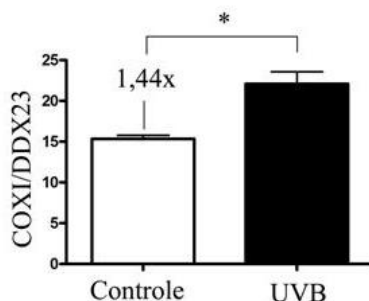


**Fonte:** Da própria autora (2018).

#### 4.8 ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA/gDNA APÓS 12 H DE EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO UVB

Embriões expostos à radiação UVB apresentaram o número de cópias de mtDNA/gDNA 1,44x maior em comparação com os embriões não irradiados ( $P < 0,05$ ) (Figura 27).

**Figura 27: Perfil do número de cópias de mtDNA/gDNA em embriões (E7) de *Macrobrachium olfersii* analisados após 12 h de exposição à radiação UVB. (\*) indica diferença significativa de  $P < 0,05$  entre os grupos. Os níveis relativos de transcrição foram indicados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (n = 3 pool de 25 mg de embriões/grupo experimental/duplicatas).**

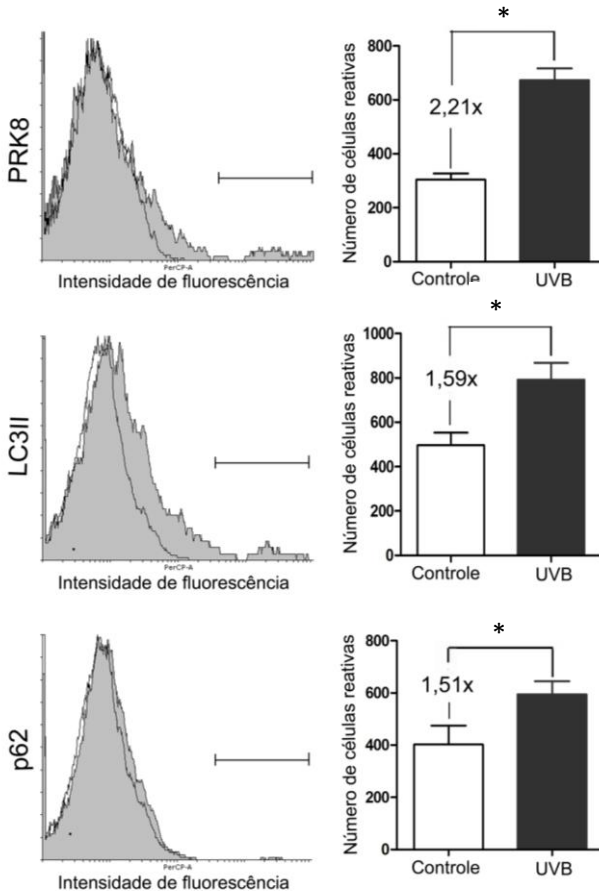


**Fonte:** Da própria autora (2018).

#### 4.9 CONTEÚDO PROTEICO DE PRK8, LC3II E p62 APÓS 12 H DE EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB

Uma vez identificadas às alterações nos níveis de transcritos relacionados aos processos de biogênese e fusão/fissão mitocondriais, foi investigada a indução de mitofagia frente à radiação UVB como mecanismo de remoção de mitocôndrias danificadas. Assim, foram quantificados os conteúdos das proteínas envolvidas no processo de mitofagia: PRK8, que são expressas em casos de danos mitocondriais; LC3II, marcador de autofagossomos; e p62, que controla o fluxo autofágico. Em células embrionárias expostas à radiação UVB, foi observado o número de células PRK8-positivas (673 células  $\pm$  43) 2,21x maior quando comparado com células embrionárias controle (304 células  $\pm$  23;  $P < 0,0001$ ). Para a proteína LC3II, embriões expostos à radiação UVB (792 células  $\pm$  76) apresentaram o número de células LC3II-positivas 1,59x maior em comparação com embriões não expostos (496 células  $\pm$  57;  $P < 0,01$ ). Quanto ao número de células p62-positivas, as células embrionárias expostas à radiação UVB (603 células  $\pm$  52) apresentaram 1,51x maior quando comparadas com as células de embriões controles (398 células  $\pm$  78;  $P < 0,0001$ ) (Figura 28).

**Figura 28: Efeito da radiação UVB sobre a indução de mitofagia nas células embrionárias de *Macrobrachium olfersii* por citometria de fluxo.** Histogramas representam a intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas. Gráficos exibem a contagem absoluta de células PRK8/LC3II/p62-positivas, indicados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (n = 3 pool de 70 mg de embriões/grupo experimental/triplicata).



**Fonte:** Da própria autora (2018).



## 5. DISCUSSÃO

Estudos relacionados ao aumento da radiação UVB na superfície terrestre, causada pelas alterações na composição da camada de ozônio, têm considerado este fator abiótico como um estressor natural que afeta os ecossistemas aquáticos. O interesse por estudar os efeitos da radiação UVB sobre os organismos em geral surgiu a partir da década de 1970, com a compreensão de que a liberação de compostos CFCs e BFCs na atmosfera são capazes de comprometer a formação da camada de ozônio e diminuir sua capacidade de atenuar a incidência da radiação UVB sobre a superfície terrestre (DIFFEY, 1991; CRUTZEN, 1974; MOLINA E ROWLAND, 1974). Inicialmente, as células humanas foram o foco principal desses estudos, que estabeleceram que a exposição à radiação UVB estava relacionada a ocorrência de câncer de pele, catarata e fotoenvelhecimento, entre outros (CADET et al., 2018; IVANOV, et al., 2018; McDANIEL et al., 2018). Estudos sobre os efeitos da radiação UVB foram ampliados para outros organismos animais, incluindo organismos aquáticos (MIGUEL et al., 2007; HOLLMANN, et al., 2016; FERNÁNDEZ et al., 2017; SCHUCH et al., 2017; BONAVENTURA et al., 2017), pois a intensidade da radiação UVB que atinge a superfície da Terra também é capaz de penetrar em ambientes aquáticos (BANCROFT et al., 2007; KARENTZ, 2008).

A expansão dos estudos com diferentes organismos modelo tem contribuído para o conhecimento das diferentes respostas celulares e moleculares frente à exposição à radiação UVB em indivíduos adultos e seus impactos ambientais. Além disso, boa parte dos estudos abordam os efeitos dessa radiação sobre culturas celulares de queratinócitos humanos. Porém, ainda existe uma carência de estudos 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 embrionário.

Neste trabalho, estudamos os efeitos da radiação UVB sobre as células embrionárias do camarão de água doce *M. olfersii*. É sabido que os ambientes de água doce são capazes de atenuar a incidência de radiação UV devido à grande quantidade de partículas orgânicas em suspensão (HERNDL et al., 1999). Porém, muitas espécies vivem e se reproduzem nas margens rasas de rios, lagos e lagoas, onde a radiação UVB penetra e afeta estes organismos em todas as fases do ciclo de vida (BANCROFT et al., 2007). O local de coleta dos animais, a Lagoa do Peri, foi escolhido por ser uma área ambientalmente protegida, onde apresenta parâmetros de qualidade da água adequados e baixa influência

de ocupação humana (HENNEMAN E PETRUCIO, 2011). Nazari et al. (2010) demonstraram que embriões de *M. olfersii* coletados na Lagoa do Peri apresentaram alterações morfológicas e celulares semelhantes de embriões irradiados artificialmente com UVB em laboratório, podendo sugerir que faixas de comprimentos de onda do espectro solar que atingem a superfície terrestre estejam comprometendo o desenvolvimento normal destes embriões em seu ambiente natural.

Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/UFSC relataram que a radiação UVB foi capaz de comprometer a viabilidade das células embrionárias de *M. olfersii*, bem como causar o desequilíbrio do conteúdo de proteínas relacionadas aos processos de fusão/fissão mitocondrial (QUADROS et al., 2016). No presente trabalho, considerando que a mitocôndria é uma organela chave para a homeostase celular, procuramos compreender as respostas morfofisiológicas e a expressão transcricional de genes envolvidos com a biogênese/fusão/fissão mitocondrial, inerente e induzível pela radiação UVB em embriões do camarão de água doce *M. olfersii*. Os resultados aqui apresentados são pioneiros em demonstrar que os níveis dos transcritos dos genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* analisados foram altamente regulados durante o desenvolvimento e induzíveis pela exposição à radiação UVB durante o desenvolvimento embrionário.

O reconhecimento das alterações mitocondriais provocadas por substâncias químicas é documentado desde a década de 1960 (CHAPPELL E GREVILLE, 1961; VILLA et al., 1961). Subsequentemente, observou-se na década de 1990 uma expansão dos relatos dos impactos mitocondriais para as células, ampliando as pesquisas que revelam a sensibilidade mitocondrial frente a agentes químicos, físicos e ambientais (PEREIRA et al. 2012; BRUNST et al. 2015; MEYER et al. 2013; 2017).

O primeiro indício de que a mitocôndria pode ser considerada um importante alvo da radiação UVB nas células embrionárias de *M. olfersii* foi evidenciado ao analisarmos a sua ultraestrutura após a exposição. Comprometimentos mitocondriais foram verificados imediatamente após 1 h de exposição à radiação UVB, demonstrando uma rápida resposta ao insulto nas células embrionárias de *M. olfersii*. Além disso, foi reconhecida uma produção de ERO após 1 h de exposição à radiação UVB, cuja resposta foi simultânea aos comprometimentos na estrutura mitocondrial também observados. Durante o metabolismo normal, as células mantem os níveis de ERO basais, os quais executam papéis importantes no crescimento e

diferenciação celular, durante os processos de desenvolvimento embrionário e também na manutenção da homeostase e adaptação ao estresse (COFFMAN et al., 2009; HUREM et al., 2018). Porém, é documentado que a radiação UVB é um potente indutor de produção de ERO (HECK et al., 2003; DHUMRONGVARAPORN et al., 2013; BRAND et al., 2018), processo pelo qual é capaz de provocar peroxidação lipídica e desencadear a perda da permeabilidade e integridade das membranas mitocondriais, como observadas após 12 h de exposição à radiação UVB.

O dano na ultraestrutura celular progressivo observado 12 h, 24 h e 48 h após a exposição à radiação UVB deve ser um efeito sinérgico tanto da formação de ERO quanto dos comprometimentos morfofuncionais mitocondriais induzidos por esta radiação. Com base nesses dados, reconhecemos a rápida produção de ERO e seus efeitos, bem como o impacto da radiação UVB diretamente nas membranas mitocondriais, demonstrando que as mitocôndrias foram alvos primários da ação da exposição à radiação UVB nas células embrionárias de *M. olfersii*.

Para sustentar esse nosso argumento, consideramos que a energia da radiação UVB pode afetar as mitocôndrias das células embrionárias de *M. olfersii* de três maneiras diferentes: (i) promovendo a perda da integridade das membranas mitocondriais pela peroxidação lipídica; (ii) promovendo a quebra da ligação peptídeo-proteína, que resulta em danos na conformação das proteínas e (iii) promovendo a quebra da ligação entre as moléculas de oxigênio. Dentro da célula, esses eventos ocorrem de modo progressivo e sinérgico (QUADROS et al., 2016).

O primeiro argumento proposto é sustentado pela formação de ERO, fenômeno observado após diferentes doses de exposição à radiação UVB, como já relatado. O segundo argumento pode ser explicado pelo fato das mitocôndrias apresentarem uma estrutura com elevada densidade proteica, além da presença de cromóforos endógenos nessas proteínas, as tornando um alvo potencial da foto-oxidação promovida pela absorção da radiação UVB (PATTISON E DAVIES, 2006). Já o terceiro argumento está relacionado com a capacidade do menor comprimento de onda da radiação UVB em gerar a quebra da ligação de moléculas de oxigênio. Este oxidante é capaz de reagir com proteínas e outros componentes celulares e induzir danos às células (WRIGHT et al., 2003).

Uma vez que o número de mitocôndrias por célula e o número de cristas por mitocôndria estão relacionados com a necessidade de

energia requerida pela célula, o comprometimento dessas estruturas provocado pela exposição à radiação UVB certamente comprometerá diferentes processos celulares inerentes ao desenvolvimento. Após a observação das alterações na morfologia mitocondrial e da indução ao aumento do conteúdo da proteína Drp1 envolvida na fissão mitocondrial (QUADROS et al., 2016), passamos a investigar neste trabalho se esse aumento é acompanhado também pelo aumento do número de cópias do mtDNA. Contudo, para compreender as respostas celulares da exposição à radiação UVB, primeiramente fez-se necessário estabelecer o padrão dos níveis de mtDNA inerentes ao desenvolvimento de embriões de *M. olfersii* não expostos à radiação UVB, visto que não há disponibilidade sobre esses dados.

Os resultados obtidos revelaram elevados níveis de mtDNA durante o estágio de clivagem, seguido de uma diminuição significativa no estágio de gástrula. A replicação do mtDNA durante a ovogênese é um processo essencial para viabilizar o pacote de mtDNA que a fêmea irá prover nas primeiras fases do desenvolvimento. Este pacote de componentes citoplasmáticos caracteriza a herança materna durante o desenvolvimento embrionário (SPIKINGS et al., 2007; WAI et al., 2008; MOORE et al., 2016). Estudos demonstram que após a fertilização não é observado ganho na quantidade de mtDNA nas células embrionárias. Esse fato aponta a ocorrência de um gargalo devido a ausência de replicação e a segregação do mtDNA a cada divisão celular durante a clivagem, resultando em uma redução do número de cópias do mtDNA por célula no início do desenvolvimento embrionário (PIKO et al., 1987; CAO et al., 2007; GUERRA, 2016). Em camundongos, a replicação do mtDNA é reiniciada no 6º dia embrionário, o qual corresponde à gastrulação, aumentando seus níveis ao longo da embriogênese (CREE et al., 2008; WAI et al., 2010), processo também identificado em *D. rerio* e *D. melanogaster* (ARTUZO et al. 2012; MA et al., 2014; HILL et al., 2014). Portanto, nossos resultados corroboram com os dados observados em outros modelos animais, demonstrando que o mtDNA materno é distribuído entre os blastômeros, não ocorrendo a replicação do mtDNA nos estágios iniciais de desenvolvimento de *M. olfersii*. Assim, os elevados níveis de mtDNA observados no estágio de clivagem estão relacionados com a necessidade das células embrionárias em manter o desenvolvimento embrionário até a ativação do genoma embrionário e retomada da replicação mitocondrial.

Uma característica interessante na segregação do mtDNA nas células embrionárias de *M. olfersii* foi que a sua diminuição não é tão

abrupta logo no início do desenvolvimento, sendo observada uma redução mais expressiva a partir de embriões em E5. Esse fato pode ser explicado pelo tipo de clivagem, meroblástica, onde apenas parte da estrutura do ovo irá formar o embrião. Assim, a celularização embrionária não é tão imediata como àquela que ocorre na clivagem holoblástica, cujos blastômeros são células individualizadas desde a primeira clivagem (MOORE, et al., 2016).

Nos embriões em E4 observou-se o início da replicação do mtDNA, cujos níveis apresentaram-se maiores quando comparados com os dias embrionários subsequentes. Estudos mostram que os embriões, de um modo geral, no início do desenvolvimento apresentam uma mudança no metabolismo energético, no qual a atividade glicolítica diminui gradualmente, aumentando a atividade fosforilativa, coincidindo com a retomada da biogênese mitocondrial e replicação do mtDNA. Entre os dias embrionários de E5 a E14, os níveis de mtDNA não diferiram.

Um crescente reconhecimento do papel desempenhado pelo mtDNA durante o desenvolvimento embrionário tem sido reportado. Estudos envolvendo os processos de replicação e transcrição do mtDNA durante o desenvolvimento embrionário têm focado mamíferos (HANCE et al., 2005; SMITH et al., 2005), *Xenopus sp.* (MEZIANE et al., 1989), *Drosophila sp.* (IVENGAR et al., 1999), *C. elegans* (BRATIC et al., 2009) e *Danio rerio* (ARTUZO et al., 2012). Sendo assim, nossos resultados contribuem para elucidar os mecanismos de biogênese mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*.

Ao avaliar o nível relativo de mtDNA após a exposição à radiação UVB nos embriões em E7, os resultados obtidos revelaram o aumento no número relativo de cópias do mtDNA. Classicamente, o gDNA é considerado o principal cromóforo da radiação UVB em diferentes organismos estudados, pois a energia da radiação coincide com a faixa de energia absorvida pelo gDNA (PETIT-FRÈRE et al., 2000; HOLICK, 2016; SCHUCH et al., 2017), porém, nossos resultados mostram que o mtDNA também deve ser considerado um importante alvo da exposição à radiação UVB.

Estudos relatam que o mtDNA é fisiologicamente mais vulnerável que o gDNA (YAKES et al., 1997; HOUTEN et al., 2006). Isso se deve ao fato de uma combinação de fatores, incluindo a ausência de íntrons que resultam em mais de 95% de sequências de codificação, a sua localização próxima ao principal gerador de ERO, a cadeia transportadora de elétrons, e a ausência de histonas protetoras e das

enzimas necessárias para a reparação de excisão de nucleotídeos, via de reparo observada na remoção de danos no gDNA (TULAH E BIRCH-MACHIN, 2013). Contudo, a via de reparo por excisão de base tem sido bem caracterizada em mitocôndrias de vários organismos (PETTEPHER et al., 1991; SAWYER et al., 1999). Danos persistentes ao mtDNA podem provocar o acúmulo de mutações, deleções ou depleções gerados pela replicação do mtDNA danificado, resultando em defeitos na montagem dos complexos e um declínio progressivo da função respiratória mitocondrial (QIAN E HOUTEN, 2010).

Estudos envolvendo a análise do mtDNA após a exposição à radiação UVB abordam principalmente seus efeitos sobre culturas de queratinócitos humanos, uma vez que o acúmulo de mutações no mtDNA tem sido proposto como uma causa do processo de envelhecimento e câncer em muitos tecidos (HWANG et al., 2009). Hudson et al., (2016) propõem em seu estudo a utilização do mtDNA como um bioindicador de danos ao DNA induzidos por UV, uma vez que a exposição à radiação UV é capaz de gerar um número 10 vezes maior de mutações no mtDNA quando comparado com o gDNA (NAIDOO et al., 2018).

Para sustentar ainda mais este resultado, avaliamos os padrões de expressão dos níveis de transcritos de fatores que regulam e mantêm o processo de biogênese mitocondrial e a replicação do mtDNA, como o *Nrf1* e *Tfam*, além dos níveis de transcritos relacionados aos processos de fusão/fissão mitocondrial, como *Mfn1* e *Drp1*. A partir do transcriptoma de embriões de *M. olfersii* (JARAMILLO et al., 2016a) foram identificadas as sequências de mRNA dos genes alvo deste estudo. Devido a escasses de estudos em crustáceos, no presente estudo foram identificadas pela primeira vez sequências de mRNA envolvidos na atividade mitocondrial de diferentes espécies presentes nos bancos EST e TSA do Genbank. Sendo assim, as análises possibilitaram reconhecer as similaridades das sequências aminoacídicas de *M. olfersii* com as sequências descritas para outras espécies de crustáceos (*M. nipponense*, *C. multidentada*, *H. americanus*, *P. clarkii*, *C. quadricarinatus*, *A. astacus*, *J. edwardsii*, *P. leptodactylus*, *C. maenas*, *L. vannamei*, *P. monodon*, *F. astecus*, *F. penicillatus*, *H. azteca*), outros organismos invertebrados aquáticos (*S. purpuratus*, *O. bimaculoides*, *L. gigantea*, *C. gigas*) e organismos-modelo em estudos de biologia do desenvolvimento (*D. rhopaloa*, *X. tropicalis*, *G. domesticus*, *M. musculus*, *H. sapiens*). O resultado do alinhamento entre as sequências selecionadas revelou que os genes analisados apresentaram caráter evolutivamente conservado, de modo que o agrupamento de *M. olfersii*

com outros indivíduos do mesmo gênero apresentou alto valor de *bootstrap*, o que confirma a similaridade entre os genes. Além disso, as sequências analisadas compartilharam uma alta identidade aminoacídica e semelhantes propriedades bioquímicas como massa molecular e ponto isoelétrico teórico (*pI*) quando comparadas com as sequências de diferentes espécies de crustáceos. Essas características podem indicar funções semelhantes desempenhadas pelos genes durante os processos fisiológicos.

Os transcritos dos genes *Tfam* e *Nrf1* nos embriões em E1 apresentaram os mais altos níveis, o que demonstram uma forte herança materna de mRNA, necessários para o início do desenvolvimento embrionário. Assim, é possível argumentar que os genes mitocondriais maternos são distribuídos passivamente entre as células durante o processo de clivagem, diminuindo seus níveis nos períodos de desenvolvimento subsequentes (ARTUZO et al., 2012). Além disso, no estudo realizado por May-Panloup et al. (2005) foi relatado que a redução significativa do número de cópias do mtDNA foi acompanhada pela diminuição dos níveis de expressão de *Tfam* em embriões suínos até o estágio de mórula.

No presente estudo, a partir do estágio de gástrula, observou-se o início da expressão zigótica de *Tfam* e *Nrf1*, sendo reconhecida pouca variação nos níveis de transcritos em E5 e E7. Subsequentemente, ocorreu um aumento dos níveis de *Tfam* e *Nrf1* em E10 e E14. Essa característica pode estar relacionada tanto com o aumento do número de células e a complexidade dos tecidos que compõem os diferentes sistemas, como ao papel desempenhado na otimização da função mitocondrial para o requerimento energético necessário para o processo de eclosão e manutenção da fase larval (DUGGER E DOBKIN, 1975). Além disso, é documentado que o número de cópias do mtDNA durante o desenvolvimento embrionário é rigorosamente regulado, pois assegura que as células atinjam níveis apropriados de metabolismo energético requerido para o processo de diferenciação e aquisição dos diferentes fenótipos celulares (JOHN et al., 2014).

Ao avaliarmos as respostas moleculares induzidas pela exposição à radiação UVB sobre as células embrionárias, nossos resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de expressão dos transcritos relacionados à biogênese mitocondrial, podendo ser considerados determinantes da quantidade de mtDNA nas células embrionárias de *M. olfersii*. É relatado que o processo de biogênese mitocondrial pode ser regulado tanto para aumentar a função mitocondrial, quanto para compensar o aumento das taxas de remoção

de mitocôndrias danificadas (DORN et al., 2015). Considerando que os fatores de transcrição analisados neste trabalho são cruciais para a regulação da transcrição e replicação do mtDNA, o aumento no número de mtDNA pode ser interpretado como uma resposta compensatória para os danos provocados pela radiação UVB nas células embrionárias.

Nosso próximo passo foi investigar os processos de fusão/fissão mitocondrial, tendo em vista que o balanço entre esses processos são fundamentais para a manutenção das funções mitocondriais adequadas durante o desenvolvimento embrionário. Nos embriões em E1, os elevados níveis de transcritos de *Mfn1* e *Drp1*, relacionados à fusão/fissão mitocondrial, respectivamente, também revelaram uma forte herança materna, assim como observado no processo de biogênese mitocondrial. Em seguida, os níveis dos transcritos em E3 e E4 apresentaram-se superiores quando comparados com embriões em E5 e E7. Estes resultados podem estar relacionados com os importantes eventos morfológicos, os quais são fundamentais para viabilizar os processos de morfogênese e organogênese no decorrer do desenvolvimento embrionário (SIMÕES-COSTA et al., 2005). Em embriões em E10 e E14 observou-se novamente o aumento dos níveis dos transcritos de *Mfn1* e *Drp1*, demonstrando que o controle adequado das funções mitocondriais é de primordial importância para a sobrevivência e crescimento embrionário.

O aumento dos níveis dos transcritos *Tfam/Nrf1* e *Mfn1/Drp1* observados em E10 e E14 são requeridos a fim de viabilizar a transição entre o estágio embrionário e larval, onde são observadas as características descritas por Müller et al. (2004) e Simões-Costa et al. (2005), como a movimentação corporal e dos apêndices, o ritmo dos batimentos cardíacos e a saída do embrião do interior do cório. Assim como os elevados níveis de transcritos nos embriões em E1 parecem viabilizar os primeiros eventos do desenvolvimento embrionário, o aumento dos níveis dos transcritos observado em E10 e E14 parece contribuir para as demandas energéticas requeridas no primeiro estágio larval. Considerando que as mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e estão constantemente em fusão/fissão para manter a homeostase e a morfologia mitocondrial, a retomada do crescimento da população mitocondrial não é apenas facilitada pelo aumento da biogênese mitocondrial e da replicação do mtDNA, mas também pelo equilíbrio adequado entre esses processos (NAN et al., 2017; REN et al., 2017).

Ao serem expostas à radiação UVB, as células embrionárias de *M. olfersii* aumentaram os níveis de transcritos de *Drp1*, sugerindo tanto



uma proteção contra eventuais danos ao mtDNA, quanto uma remoção de mtDNA danificados e mitocôndrias disfuncionais pela intensificação do processo de fissão mitocondrial frente à exposição à radiação UVB (MEYER et al., 2017; 2018). Interessantemente, Tondera et al (2009) demonstraram que tratamentos com baixos níveis tóxicos de radiação UV têm efeitos opostos à apoptose, pois induzem a formação de grandes redes mitocondriais por fusão mitocondrial, a qual confere alto grau de resistência ao insulto. Porém, nossos resultados não demonstraram alteração nos níveis de transcritos de *Mfn1*, revelando que a dose de radiação UVB utilizada neste trabalho foi capaz de provocar danos mitocondriais relevantes, e conseqüentemente, indução de apoptose das células de *M. olfersii*, como relatado por Schramm et al. (2017).

O processo de fissão mitocondrial desempenha um papel na segregação de mitocôndrias disfuncionais e no desencadeamento do processo de mitofagia, e neste trabalho, visamos elucidar a interação entre esses processos. Nossos resultados revelaram um aumento no conteúdo de proteínas envolvidas na maquinaria do processo de mitofagia em células de *M. olfersii* expostas à radiação UVB. Yoshii et al. (2011) demonstraram que a proteína Parkina medeia a degradação de proteínas da membrana mitocondrial associada a sua ruptura, proporcionando assim a liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, ou indutores de apoptose. Assim, a dinâmica mitocondrial e mitofagia são processos reguladores essenciais do controle da qualidade da rede mitocondrial e desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase em células saudáveis (MISHRA E CHAN, 2016). Além disso, o fluxo constante entre degradação e biogênese tende a atingir um equilíbrio, permitindo um volume mitocondrial adequado (WEBER et al., 2010; ANZEL et al. 2018).

Em resumo, os resultados obtidos revelaram que a mitocôndria, além do gDNA, também pode ser considerada um importante alvo da exposição à radiação UVB, considerando as importantes alterações observadas na sua ultraestrutura. Além disso, este trabalho reporta pela primeira vez o comportamento cronológico de diferentes perfis de transcritos de genes envolvidos nos processos de biogênese/fusão/fissão mitocondrial, os quais mostraram serem altamente regulados durante o desenvolvimento embrionário em respostas às demandas fisiológicas e induzíveis pela exposição à radiação UVB.

Diante do panorama geral dos resultados obtidos, podemos aceitar todas as hipóteses propostas neste trabalho de que (i) os transcritos dos genes relacionados à biogênese mitocondrial, *Tfam* e *Nrf1*, bem como os transcritos envolvidos com os processos de

fusão/fusão mitocondrial, *Mfn1* e *Drp1*, aumentam seus níveis durante o desenvolvimento embrionário, evidenciado nos dias embrionários finais; (ii) a radiação UVB comprometeu a ultraestrutura mitocondrial das células embrionárias de *M. olfersii*; (iii) a exposição à radiação UVB causou o aumento dos níveis de transcritos envolvidos com a biogênese mitocondrial, *Tfam* e *Nrfl*, refletindo no aumento do número de cópias do mtDNA, e por fim (iv) os níveis dos transcritos do gene relacionado ao processo de fissão mitocondrial *Drp1* também mostrou-se elevados após a exposição à radiação UVB, cujo aumento pode estar relacionado com a eliminação dos danos mitocondriais pelo processo de mitofagia, evidenciado pelo aumento do conteúdo das proteínas PRK8, LC3II e p62. Assim, o aumento nos processos de biogênese mitocondrial concomitante ao processo de mitofagia fornecem fortes evidências de que as células embrionárias expostas à radiação UVB apresentam um mecanismo compensatório ao dano, a fim de manter a rede mitocondrial saudável.

Tendo em vista o aumento da incidência de radiação UVB que atinge a superfície terrestre, e que a sua exposição pode não ser evitada em determinados ambientes, este fator abiótico pode comprometer mecanismos e eventos celulares em diferentes organismos. Nesta perspectiva, o presente estudo trás a utilização de um modelo experimental emergente, o qual se mostrou adequado para contribuir para a construção do conhecimento atual sobre as respostas biológicas frente à exposição à radiação UVB. A escassez de estudos disponíveis na literatura que abordam o efeito da radiação UVB em crustáceos e a utilização de ferramentas de análise molecular baseada no transcriptoma dos embriões de *M. olfersii* evidencia o caráter inovador e inédito deste trabalho. Além disso, nossos resultados contribuem para que a espécie de *M. olfersii* possa ser considerada um animal-modelo para estudos em biologia do desenvolvimento e embriotoxicidade. Por fim, considerando nossos resultados e o conhecimento atual sobre os efeitos da radiação UVB, apontamos a mitocôndria como um importante alvo celular dessa radiação nas células embrionárias de *M. olfersii*. Propomos que as respostas mitocondriais sejam usadas como uma ferramenta para avaliação do estresse ambiental causado pela radiação UVB em embriões de espécies aquáticas.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- Os genes *Tfam* e *Nrf1*, envolvidos no processo de biogênese mitocondrial e os genes *Mfn1* e *Drp1*, envolvidos no processo de fusão/fissão mitocondrial foram identificados no transcriptoma de embriões de *M. olfersii*;
- Os genes *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* foram comparados com sequências disponíveis em bancos de dados de outros invertebrados e vertebrados, e através da relação filogenética entre as sequências analisadas, se mostraram conservados pela alta similaridade dentro da Ordem Decapoda;
- Os níveis de transcritos de *Tfam*, *Nrf1*, *Mfn1* e *Drp1* dos embriões de *M. olfersii* analisados nos dias embrionários apresentaram-se altamente regulados, refletindo a demanda energética requerida em cada dia do desenvolvimento embrionário;
- Os níveis relativos de mtDNA exibem forte herança materna, apresentando baixa expressão nas etapas iniciais do desenvolvimento e mantendo-se constante ao longo do desenvolvimento embrionário de *M. olfersii*;

Além disso, nossos resultados revelaram que a exposição à radiação UVB interferiu em embriões em E7 de *M. olfersii* causando:

- Alterações ultraestruturais, sendo a mais evidente causada nas mitocôndrias com a redução e perda das cristas mitocondriais e a desestruturação da membrana mitocondrial externa;
- Aumento da produção de ERO após 1 h de exposição, regularizando seus níveis após 48 h de exposição à radiação UVB;
- Aumento dos níveis de mtDNA em conjunto com os níveis de transcrito de *Tfam*, *Nrf1*, revelando o aumento da biogênese mitocondrial;
- Aumento dos níveis de transcrito de *Drp1* em conjunto com o aumento do conteúdo proteico de PRK8, LC3II e p62 evidenciando a eliminação dos danos mitocondriais pelo processo de mitofagia;



## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2010). *Biologia Molecular da célula*, 5 edn (Rio de Janeiro: Artmed).
- AMMAR, D.; MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M. (2001). Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina. *Rev B Zoo*, 18: 529-537.
- ANZELL, A.R.; MAIZY, R.; PRZYKLEK, K.; SANDERSON, T.H. (2018). Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol*, 55 (3): 2547-2564. Doi: 10.1007/s12035-017-0503-9.
- ARTUZO, L.; ROMANO, A.; VERRI, T.; DOMENICHINI, A.; ARGENTON, F.; SANTORELLI, F.M.; PETRUZZELLA, V. (2012). Mitochondrial DNA metabolism in early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim Biophys Acta*, 1817 (7): 1002-1011. Doi: 10.1016/j.bbabi.2012.03.019
- BALABAN, R.S.; NEMOTO, S.; FICKEL, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120: 483-495.
- BALÁZS, A.; KRIFATON, C.; OROSZ, I.; SZOBOSZLAY, S.; KOVÁCS, R.; KRISZT, B. (2016) Hormonal activity, cytotoxicity and developmental toxicity of UV filters. *Ecotoxicol Environ Safe*, 131: 45-53. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.037.
- BANASZAK, A.T. (2003). Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. 1: 329-356.
- BANCROFT, B.A.; BAKER, N.J.; BLAUSTEIN, A.R. (2007). Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Eco Ecotoxicol Environ Safe Lett*, 10: 332-345. Doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01022.x.
- BENARD, G.; KARBOWSKI, M. (2009). Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol*, 20: 365-374.
- 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.
- BIEL, T.G.; RAO, V.A. Mitochondrial dysfunction activates lysosomal-dependent mitophagy selectively in cancer cells. *Oncotarget*, 9 (1): 995.

- BJORN, L.O. (1999). Ultraviolet radiation, the ozone layer and ozone depletion. *Stratospheric Ozone Depletion: The Effects of Enhanced UV-B Radiation on Terrestrial Ecosystems*. *Rozema*, 21–37.
- BÖHM, M.; HILL, H.Z. (2016). Ultraviolet B, melanin and mitochondrial DNA: Photo-damage in human epidermal keratinocytes and melanocytes modulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Res Not*, 12: 5:881. Doi: 10.12688/f1000research.8582.1.
- BOLDOGH, I.R.; PON, L.A. (2006). Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1763(5–6):450–462.
- BONAVENTURA, R.; MATRANGA, V. (2017). Overview of the molecular defense systems used by sea urchin embryos to cope with UV radiation. *Mar Environ Res*, 128: 25-35. Doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.019.
- BRAND, R.M.; WIPF, P.; DURHAM, A.; EPPERLY, M.W.; GREENBERGER, J.S.; FALO, L.D. (2018). Targeting Mitochondrial Oxidative Stress to Mitigate UV-induced Skin Damage. *Dront Pharmacol*, 20: 9-920. Doi: 10.3389/fphar.2018.00920.
- BRASSEUR, G.; RUDDER, A.; TRICOT, C. (1985). Stratospheric response to chemical perturbations. *J Atmos Chem*, 3 (2): 261-288.
- BRATIC, J.; HENCH, J.; HENRIKSSON, A.; ANTEBI, T.R.; BÜRGLIN, A. (2009). Mitochondrial DNA level, but not active replicase, is essential for *Caenorhabditis elegans* development. *Nucleic Acids Res*, 37: 1817–1828.
- 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.
- BRUNST, K.J.; BACCARELLI, A.A.; WRIGHT, R.J. (2015). Integrating mitochondriomics in children's environmental health. *J Appl Toxicol*, 35: 976–991.
- BURMAN, J.; PICKLES, S.; WANG, C.; YOULE, A.M.; NEZICH, C.; WU, X.; HAMMER, J.A.; YOULE, R.J. (2016). Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol*, 2; 216(10): 3231–3247. Doi: 10.1083/jcb.201612106.
- CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res*, 571: 3-17. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012.

- CADET, J., DOUKI, T. (2018). Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem Photobiol Sci*. Doi: 10.1039/c7pp00395a.
- 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*, 397: 106-120. Doi: 10.1016/j.jembe.2010.11.022.
- CAO, L.; SHITARA, H.; HORII, T.; NAGAO, Y.; IMAI, H. (2007). The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet*, 39: 386–390.
- Centro de estudos cultura e cidadania (CECA). Uma cidade numa ilha: relatório sobre os problemas sócio-ambientais da Ilha de Santa Catarina. *Editora Insular*, 1: 73-96.
- CERVENY, K.L.; TAMURA, Y.; ZHANG, Z.; JENSEN, R.E. SESAKI, H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol*, 17: 563-9. Doi: 10.1016/j.tcb.2007.08.006.
- CHAPPEL, J.B.; GREVILLE, G.D. (1961). Effects of Oligomycin on Respiration and Swelling of Isolated Liver Mitochondria. *Nature*, 190: 502-504.
- CHAN, D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22:79-99. Doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638.
- CHAN, D.C. (2012). Fusion and fission: interlinking processes critical for mitochondrial health. *Ann Rev Genet*, 46: 265 – 287.
- CHANG, C.R.; BLACKSTONE, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification-related protein Drp1. *Ann Acad Sci*, 1201: 34-9. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05629.x.
- CHEN H.; DETMER S.A.; EWALD A.J.; GRIFFIN E.E.; FRASER S.E.; CHAN D.C. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160: 189–200. Doi: 10.1083/jcb.200211046.
- 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.
- CHOWDHARY, S.; TOMER, D.; DUBAL, D.; SAMBRE, D.; RIKHY, R. (2017). Analysis of mitochondrial organization and function in the *Drosophila* blastoderm embryo. *Sci Rep*, 14: 5502. Doi: 10.1038/s41598-017-05679-1.

- COFFMAN, J.A.; COLUCCIO, A.; PLANCHART, A.; ROBERTSON, A.J. (2009). Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo III. Role of mitochondrial redox signaling via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Dev Biol*, 330: 123–130.
- CONNELLY, S.J.; MOELLER, R.E.; SANCHEZ, G.; MITCHELL, D.L. (2009). Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochem Photobiol*, 85: 144-152. Doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00408.x.
- CREE, L.M.; SAMUELS, D.C.; DE SOUSA LOPES S.C.; RAJASIMHA, H.K.; WONNAPINIJ, P. (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet*, 40: 249–254.
- CROTEAU, M.C.; DAVIDSON, M.A.; LEAN, V.L.; TRUDEAU, V. (2008). Global increase in Ultraviolet B Radiation: Potential impacts on Amphibian Development and Metamorphosis. *Physiol Biochem Zool*, 81.
- CRUTZEN, P.J. (1974). Estimates of possible variations in total ozone due to natural causes and human activities. *Ambio*, 3: 201-210.
- CUBILLOS, V.M.; BURRITT, D.J.; LAMARE, M.D.; PEAKE, B.M. (2015). The relationship between UV-irradiance, photoprotective compounds and DNA damage in two intertidal invertebrates with contrasting mobility characteristics. *Photochem Photobiol Sci*, 149: 280-288. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.06.001.
- CYWINSKA, A.; CRUMP, D.; LEAN, D. (2000). Influence of UV radiation on four freshwater invertebrates. *Photochem Photobiol Sci*, 72: 652–659. Doi: 10.1562/0031-86550720652IOUROF2.0.CO2.
- DAHMS, H.U.; LEE, J.S. (2010). UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat Toxicol*, 97: 3-14. Doi: 10.1016/j.aquatox.2009.
- DESPIC, V.; DEJUNG, M.; BUTTER, F.; NEUGEBAUER, K.M. (2017). Analysis of RNA-protein Interaction in vertebrate embryos using UV crosslinking approaches. *Methods*, 2023: 30445-5. Doi: 10.1016/j.ymeth.2017.07.013.
- DHUMRONGVARAPORN, A.; CHANVORACHOTE, P. (2013). Kinetics of ultraviolet B irradiation-mediated reactive eoxygen species generation in human keratinocytes. *J Cosmet Sci*, 64: 207–217.
- 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? *Photodermatol Photo*, 18: 68-74. Doi: 10.1034/j.1600-0781.2002.180203.x.
- DONG, Q.; TODD, W.; TIERSCH, T.R.; SVOBODA, K.R. (2008). UVA-induced photo recovery during early zebrafish embryogenesis. *J Photochem Photobiol B*, 93: 162-171. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.07.011.
- DOS SANTOS, C.P.; LONDERO, J.E.L.; DOS SANTOS, M.B.; FELTRON, R.D.S.; LOEBENS, L.; MOURA, L.B.; CECHIN, S.Z.; SCHUCH A.P. (2018). Sunlight-induced genotoxicity and damage in keratin structures decrease tadpole performance. *J Photochem Photobiol B*, 181: 134-142. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.03.013.
- D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. (2013). UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*, 14, 12222-12248.
- DORN, G.W.; VEGA, R.B.; KELLY, D.P. (2015). Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes Dev*, 29: 1981-199.
- DUGGER, D.M.; DOBKIN, S. (1975). A contribution to knowledge of the larval development of *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana*, 29: 1-30.
- EKSTRAND, M.I.; FALKENBERG, M.; RANTANEN, A.; PARK, C.B.; GASPARI, M.; HULTENBY, K.; RUSTIN, P.; LARSSON, N. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Gen*, 13: 935-944. Doi: 10.1093/hmg/ddh109.
- EPEL, D. (2003). Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. *Evol Dev*, 5: 83-88. Doi: 10.1046/j.1525-142X.2003.03013.x
- FACHAL, L.; MOSQUERA-MIGUEL, A.; GÓMEZ-CAAMAÑO, A.; SÁNCHEZ-GARCÍA, M.; CALVO, P.; LOBATO-BUSTO, R. (2014). Evaluating the role of mitochondrial DNA variation to the genetic predisposition to radiation-induced toxicity. *Radiother Oncol*, 111(2):199-205.
- FALKENBERG, M.; LARSSON, N.G.; GUSTAFSSON, C.M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 76: 679-699.
- FANG, X.; RAVISHANKARA, A.R.; VALDERS, G.J.M., MOLINA; M.J., SU, S.;ZHANG, J.; PRINN, R.G. (2018) Changes in Emissions of Ozone-Depleting Substances from China Due to Implementation of the Montreal Protocol. *Environ Sci Technol*, 2;52 (19): 11359-11366. Doi: 10.1021/acs.est.8b01280.

- FARMAN, J.C.; GARDINER, B.G.; SHANKLIN, J.D. (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature*, 315: 207-210.
- FERNÁNDEZ, C.E.; REJAS, D. (2017). Effects of UVB radiation on grazing of two cladocerans from Andean lakes. *Plos one*, 12(4): e0174334. Doi: 10.1371/journal.pone.0174334.
- FICHER, J., PHILLIPS, N.E. (2014). Carry-over effects of multiple stressors on benthic embryos are mediated by larval exposure to elevated UVB and temperature. *Glob Chang Biol*, 20 (7): 2108-16. Doi: 10.1111/gcb.12472.
- FUKUNISHII, Y.; BROWMAN, H.I.; DURIF, C.M.; BJELLAND, R.M.; SHEMA, S.D.; FIELDS, D.M.; SKIFTESVIK, A.B. (2013). Sub-lethal exposure to ultraviolet radiation reduces prey consumption by Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Mar Biol*, 160: 2591-2596.
- GODAR, D.E.; POPE, S.J.; GRANT, W.B.; HOLICK, M.F. (2012). Solar UV doses of young Americans and vitamin D3 production. *Environ Health Persp*, 120: 139-143. Doi: 10.1289/ehp.1003195.
- 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 *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochem Photobiol*, 81: 398-403. Doi: 10.1562/2004-05-26-RA-179.
- GUERRA, D.; GHISELLI, F.; MILANI, L.; BRETON, S.; PASSAMONTI, M. (2016). Early replication dynamics of sex-linked mitochondrial DNAs in the doubly uniparental inheritance species *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia Veneridae). *Heredity*, 116: 324-332.
- GUERRA, K.C.; CRANE, J.S. (2018). Cancer, Skin, Prevention. *Stat Pearls Publishing LLC*.
- HÄDER, D.P. (2003). Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem Photobiol Sci*, 2: 39-50.
- HÄDER, D.P.; HELBLING, E.W.; WILLIAMSON, C.E.; WORREST, R.C. (2011). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci*, 10: 242-260.
- HANCE, M.; EKSTRAND, I.; TRIFUNOVIC, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet*, 14:1775-1783.

- HALLIWELL, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res Commun.*, 9:1-32.
- HECK, D.E.; VETRANO, A.M.; MARIANO, T.M.; LASKIN, J.D. (2003). UVB light stimulates production of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 278: 22432–22436.
- HELLUY, S.M.; BELTZ, B.S. (1991). Embryonic development of the American lobster (*Homarus americanus*): quantitative staging and characterization of an embryonic molt cycle. *Biol Bull*, 180: 355-371.
- HENNEMANN, M.C.; PETRUCIO, M.M.; (2011). Spatial and temporal dynamic of trophic relevant parameters in a subtropical coastal lagoon in Brazil. *Environ Monit Assess*, 181: 347–361. Doi: 10.1007/s10661-010-1833-5.
- HERBERS, H.; KEKÄLÄINEN, N.J.; HANGAS, A.; POHJOISMÄKI, J.L.; GOFFART, S. (2018). Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion*, S1567-7249 (17): 30342-2. Doi: 10.1016/j.mito.2018.01.004.
- HERNDL, G.J.; ARRIETA, J.M.; KAISER, E.; OBERNOSTERER, I.; PAUSZ, C.; REITNER, B. (1999). Role of ultraviolet radiation in aquatic systems: interaction between mixing processes, photochemistry and microbial activity. in: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P.(Eds.), *Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8 th International Symposium on Microbial Ecology*, Canada, 209–219.
- HILL, J.H.; CHEN, Z.; XU, H. (2014). Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nat Gene*, 46: 389–392.
- HOLICK, M.F. (2016). Biologic effects of sunlight, ultraviolet radiation, visible light, infrared, and vitamin D for health. *Anticancer*, 36: 1345-1356.
- HOLLMANN, G.; FERREIRA, G.J.; GEIHS, M.A.; VARGAS, M.A.; ALLODI, S. (2015). Antioxidant activity stimulated by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquat Toxicol*, 160: 151-162. Doi: 10.1016/j.aquatox.2015.01.008
- HOLLMANN, G.; LINDER, R.; GIANGRANDE, A.; ALLODI, S. (2016). Increased p53 and decreased p21 accompany apoptosis induced by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquat Toxicol*, 173: 1-8. Doi: 10.1016/j.aquatox.2015.12.025

- HOLTHUIS, L.B. (1952). A general revision of the Palaemonidae (Crustacea Decapoda Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemoninae. *Allan Hancock Foundation Publications, Occasional Papers*, 12: 1–396.
- HORNECK G. (1995). Quantification of the biological effectiveness of environmental UV radiation. *J. Photochem. Photobiol*, 31: 43-49.
- HOUTEN, B.V.; WOSHNER, V.; SANTOS, J.H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repairs*, 5: 145-152. Doi: 10.1016/j.dnarep.2005.03.002
- HUREM, S.; FRASER, T.W.K.; GOMES, T.; MAYER, I.; CHRISTENSEN, T. (2018). Sub-lethal UV radiation during early life stages alters the behaviour, heart rate and oxidative stress parameters in zebrafish (*Danio rerio*). (2018). *Ecotoxicol Environ Safe*, 39: 359-365. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.082.
- HWANG, B.; KUTTAMPEROOR, F.; WU, J.; STEINBERG, M.L. (2009). Spectrum of mitochondrial DNA deletions within the common deletion region induced by low levels of UVB irradiation of human keratinocytes in vitro. *Gene*, 440: 23-26. Doi: 10.1016/j.gene.2009.03.019.
- ISHIHARA, N.; OTERA, H.; OKA, T.; MIHARA, K. (2013). Regulation and physiologic functions of GTPase in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signal*, 19(4): 389-99. Doi: 10.1089/ars.2012.4830.
- ISHIHARA, T.; KOHNO, H.; ISHIHARA, N. (2015). Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and mouse development. *Ann NY Acad Sci*, 1350: 77-81. Doi: 10.1111/nyas.12848.
- IVANOV, I.V.; MAPPE, T.; SCHAUPP, P.; LAPPE, C.; WAHL, S. (2018). Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health. *J Biophot*, 11 (7): e201700377. Doi: 10.1002/jbio.201700377.
- JARAMILLO, M.L.; GUZMAN, F.; PAESE, C.L.; MARGIS, R.; NAZARI, E.M.; AMMAR, D., MÜLLER, Y.M.R. (2016). Exploring developmental gene toolkit and associated pathways in a potential new model crustacean using transcriptomic analysis. *Dev Genes Evol*, 226: 325–337. Doi: 10.1007/s00427-016-0551-6.
- JARAMILLO, M.L.; AMMAR, D.; QUISPE, R.L.; GUZMAN, F.; MARGIS, R.; NAZARI, E.M.; MÜLLER, Y.M. (2017) Identification and evaluation of reference genes for expression studies by RT-qPCR during embryonic development of the emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*. *Gene*, 598: 97-106.

- JOHN, J. (2014). The control of mtDNA replication during differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*, 1840 (4): 1345–1354. Doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.036.
- JORNAYVAZ, F.R.; SHULMAN, G.L. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, 47: 69-84. Doi: 10.1042/bse0470069.
- JUGÉ, R.; BREUGNOT, J.; SILVA, C.; BORDES, S.; CLOSS, B.; AOUACHERIA, A. (2016). Quantification and characterization of UVB-induced mitochondrial fragmentation in normal primary human keratinocytes. *Scientific Reports*, 6: 35-65. Doi: 10.1038/srep35065.
- KAM, W.W.; BANATI, R.B. (2013). Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 65: 607–19.
- KARENTZ, D.; LUTZE, L.H. (1990). Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnol Oceanog*, 35: 549-561. Doi: 10.4319/lo.1990.35.3.0549.
- KARENTZ, D.; BOSCH, I. (2001). Influence of Ozone-Related Increases in Ultraviolet Radiation on Antarctic Marine Organisms. *A. Zool*, 41: 3–16.
- KENNEDY, E.P.; LEHNINGER, A.L. (1950). The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 185: 275-285.
- KENNEDY, E.P.; LEHNINGER, A.L. (1951). Activation of fatty acid oxidation by dihydrodiphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem*, 190: 361-368.
- KIM, B.M.; RHEE, J.S.; LEE, K.W.; KIM, M.J.; SHIN, K.H.; LEE, S.J.; LEE, J.S. (2015). UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comp Biochem Physiol Part C*, 167: 15-23. Doi: 10.1016/j.cbpc.2014.08.003.
- KIRCHHOFF, V.W.J.H.; SCHUCH, N.J.; PINHEIRO, D.K., HARRIS, J.M. (1996). Evidence for an ozone hole perturbation at 30° South. *Atmos Environ*, 33: 1481-1488.
- KIRCHHOFF, V.W.J.H. (2000). A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. *Braz J Geoph*, 18 (1): 63-74.
- KOTIADIS, V.N.; DUCHEN, M.R.; OSELLAME, L.D. (2014). Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim Biophys Acta*, 1840 (4): 1254-1265. Doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.041

- KRAUS F.; RYAN M.T. (2017) The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *J Cell Sci*, 130: 2953–2960. Doi: 10.1242/jcs.199562.
- KUKAT, C.; DAVIES, K.M.; WURM, C.A.; SPAHR, H.; BONEKAMP, N.A.; KUHL, I.; JOOS, F.; POLOSA, P.L.; PARK, C.B.; POSSE, V.; FALKENBERG, M.; JAKOBS, S.; KUHLBRANDT, W.; LARSSON, N.G. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 11288-11293.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 35: 1547–1549.
- LAND, M.F.; NILSSON, D.E. (2002). *Animal Eyes*. Oxford University Press. Oxford, UK. 288.
- LI, C.; MA, L.; MOU, S.; WANG, Y.; ZHENG, Z.; LIU, F.; QI, X., MIAO, J. (2015). Cyclobutane pyrimidine dimers photolyase from extremophilic microalga: remarkable UVB resistance and efficient DNA damage repair. *Mutat Res*, 773: 37-42. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.07.010.
- LIESA, M.; PALACIN, M.; ZORZANO, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, 89 (3): 799-845.
- LIN J.; HANDSCHIN C.; SPIEGELMAN B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 1:361–370. Doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25 (4): 402-408.
- LJUBICIC, V.; JOSEPH, A.M.; SALEEM,A.; HOOD, D.A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1800(3): 223-34. Doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.031.
- LISBOA, L.K.; SILVA, A.L.L.; PETRUCIO, M.M. (2011). Aquatic invertebrate's distribution in a freshwater coastal lagoon of southern Brazil in relation to water and sediment characteristics. *Acta Limnol Brasil*, 23 (2): 119-127.
- LOSON O.C.; SONG Z.; CHEN H.; CHAN D.C. (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 24: 659–667. Doi: 10.1091/mbc.e12-10-0721.

- MA. H.; XU, H.; O'FARRELL, P.H. (2014). Transmission of mitochondrial mutations and action of purifying selection in *Drosophila melanogaster*. *Nat Gene*, 46:393–397.
- MAVERAKIS, E.; MIYAMURA, Y.; BOWEN, M.P.; CORREA, G.; ONO, Y.; GOODARZI, H. (2010). Light, including ultraviolet. *J Autoimmun*, 34: 247-57.
- MAY-PANLOUP, P.; VIGNON, X.; CHRETIEN, M.F.; HEYMAN, Y.; REYNIER, P. (2005). Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reprod Biol Endocrinol*, 3: 65.
- MCBRIDE, H.M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 16: 51-60. Doi: 10.1016/j.cub.2006.06.054.
- MCDANIEL, D.; FARRIS, P.; VALACCHI, G. (2018) Atmospheric skin aging-contributors and inhibitors. *J Cosmet Dermatol*, 17 (2): 124-137. Doi: 10.1111/jocd.12518.
- MEARS J.A.; LACKNER L.L.; FANG S.; INGERMAN E.; NUNNARI J.; HINSHAW J.E. (2011) Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*, 18: 20–26. Doi: 10.1038/nsmb.1949.
- MEYER, J.N.; LEUTHNER, T.C. AND LUZ, A. L. (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicol*, 391: 42–53. Doi: 10.1016/j.tox.2017.07.019.
- MEZIANE, A.; CALLEN, C.; MOUNOLOU, C. (1989). Mitochondrial gene expression during *Xenopus laevis* development: a molecular study. *EMBO J*, 8(6): 1649–1655.
- MEYER, J.N.; LEUNG, M.C.; ROONEY, J.P.; SENDOEL, A.; HENGARTNER, M.O.; KISBY, G.E.; BESS, A.S. (2013). Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol*, 134: 1–17.
- MEYER, J.N.; CHAN, S.S.L. (2017). Sources, mechanisms, and consequences of chemical-induced mitochondrial toxicity. *Toxicol*, 391: 2.
- MEYER, J. N.; HARTMAN, J.H., AND MELLO, D.F. (2018). Mitochondrial Toxicity. *Toxicol*, 162 (1): 15–23. Doi:10.1093/toxsci/kfy008.
- 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*, 33 (7): 627-637.

- MIGUEL, N.C.O.; WAISENSEN, I.J.; TAKIVA, C.M., TORLETE, G.G. (2007). Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell and Tissue Res*, 329: 159-168. Doi: 10.1007/s00441-007-0410-x
- MISHRA, P.; CHAN, D.C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*, 201511036.
- MOLINA, M.J.; ROWLAND, F.S. (1974). Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature*, 249: 810-812. Doi: 10.1038/249810a0.
- MORESINO, R.D.H.; GONÇALVES, R.J.; HELBLING, E.W. (2011). Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. *J Experiment Mar Biol Ecol*, 407 (2): 363-369.
- MOZDY A.D.; MCCAFFERY J.M.; SHAW J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1. *J Cell Biol*, 151: 367–380. Doi: 10.1083/jcb.151.2.367.
- 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 Ratones, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Zool*, 16: 629-636.
- 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. Doi: 10.1590/S0101-81752004000100005.
- MURATA, Y.; OSAKABE, M. (2017). Photo-enzymatic repair of UVB-induced DNA damage in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol*, 71: 15-34. Doi: 10.1007/s10493-016-0100-z.
- MURPHY, M. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417: 1-13.
- 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*. *Sci Tot Environ*, 407: 1892-1900. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.044.
- NAIDOO, K.; HANNA, R., AND BIRCH-MACHIN, M.A. (2018). What is the role of mitochondrial dysfunction in skin photoaging? *Exp Dermatol*, 27: 124–128. Doi: 10.1111/exd.13476.



- NAKADA, K.; INOUE, K.; ONO, T.; ISOBE, K.; OGURA, A.; GOTO, Y.; NONAKA, I.; HAYASHI, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med*, 7: 934–940.
- NAN, J.; ZHU, W.; RAHMAN, M.S.; LIU, M.; LI, D.; SU, S.; WANG, J. (2017). Molecular regulation of mitochondrial dynamics in cardiac disease. *Biochim Biophys Acta*, 1864 (7): 1260-1273. Doi:10.1016/j.bbamcr.2017.03.006.
- NASSER, N. (2010). UVB: susceptibility in malignant melanoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85: 843-848. Doi: 10.1590/S0365-05962010000600010.
- NAZARI, E.; 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 potiana* 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.; ALLODI, S. (2010). Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquat Toxic*, 98: 25-33. Doi: 10.1016/j.aquatox.2010.01.010.
- NAZARI, E.M.; AMMAR, D.; MULLER, Y.M.R.; ALLODI, S. (2013). Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. In: Allodi, S., Nazari, E.M. (Eds.), *Exploring Themes on Aquatic Toxicology*. Research Signpost, India, pp. 103–118.
- NGO, H.B.; KAISER, J.T.; CHAN, D.C. (2011). The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 18: 1290–1296.
- NGO H.B.; LOVELY G.A.; PHILLIPS R.; CHAN D.C. (2014) Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nat Commun*, 5: 3077. Doi: 10.1038/ncomms4077.
- NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148: 1145–1159. Doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
- NUÑEZ, E.T.; SOBRINO, C.; NEALE, P.J.; CEINOS, R.M.; SU, S.; RPTLANT, J. (2012) Molecular response to ultraviolet radiation exposure in fish embryos: implications for survival and morphological development. *Photochem Photobiol*, 88(3):701-7. Doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01088.x.

- NÚÑES-PONS, L.; AVILA, C.; ROMANO, G.; VERDE, C.; GIORDANO, D. (2018). UV- protective compounds in Marine Organisms from the Sourthern Ocean. *Mar drugs*, 16: 336. Doi: 10.3390/md16090336.
- O'SULLIVAN, F.; LAIRD, E.; KELLY, D.; VAN GEFFEN, J.; VAN WEELE, M.; MCNULTY, H.; HOEY, L.; MC CARROLL, K.; CUNNINGHAM, C.; ZGAGA, L. (2017). Ambient UVB dose and sun enjoyment are important predictors of Vitamin D status in an older population. *J Nutr*, 147: 858-868. Doi: 10.3945/jn.116.244079.
- PAGLIUSO, A.; COSSART, P.; STAVRU, F. (2018). The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell Mol Life Sci*, 75 (3): 355-374. Doi: 10.1007/s00018-017-2603-0.
- PALIKARAS, K.; LIONAKI, E.; TAVERNARAKIS, N. (2015). Interfacing mitochondrial biogenesis and elimination to enhance host pathogen defenses and longevity. *Woem*, 29. Doi: 10.1080/21624054.2015.1071763
- PASSAGLIA S, A.; DOS SANTOS, M.B.; MENDES L.V.; VAZ P.L.; DOS SANTOS, C.P.; ZANINI C.S.; JORGE, S.N.; KIRSH, P.D.; SILVA, L.E.L. (2015). Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic theefrof species. *Ecotoxicol Environ Safe*, 118:190-8. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.029.
- PATTISON, D.I.; DAVIES, M.J. (2006) .Actions of ultraviolet light on cellular structures. In: Bignold, L.P. (Ed.), *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*. Birkhäuser, Basel,131–157.
- PAUL, N. D.; GWYNN, J. 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). Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photoderm Photoim Photomed*, 24: 115–122. Doi:org/10.1111/j.16000781.2008.00348.x.
- PETTEPHER, C.C.; LEDOUX, S.P.; BOHR, V.A.; WILSON, G.L. (1991). Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosoarea streptozotocin, *J. Biol Chem*, 266: 3113–3117.
- PEREIRA, C.V.; OLIVEIRA, P.J.; WILL, Y.; NADANACIVA S. (2012). Mitochondrial bioenergetics and drug-induced toxicity in a panel of mouse embryonic fibroblasts with mitochondrial DNA

- single nucleotide polymorphisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 264: 167–181.
- PETIT-FRÈRE, C.; CAPULAS, E.; LOWE, J.E.; KOULU, L.; MARTTILA, R.J.; JASPERS, N.G., CLINGEN, P.H., GREEN, M.H., ARLETT, C.F. (2000). Ultraviolet-B-induced apoptosis and cytokine release in xeroderma pigmentosum keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 115: 687–693. Doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00093.x.
- PFÄFFL, M.W.(2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9): e45.
- PFÄFFL, M.W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S. A. (Ed.). *A-Z of quantitative PCR*, 87–112.
- PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H.; BESARATINIA, A. (2005). Mutation induced by ultraviolet light. *Mut Res*, 571: 19-31. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.057.
- PICKLES, S.; VIGIE, P.; YOULE, R. J. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Cur Biol*, 28 (4): 170-185.
- PIKO, L.; TAYLOR, K.D. (1987). Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol*, 123: 364–374.
- PUTHUMANA, J.; LEE, M.C.; PARK, J.C.; KIM, H.S.; LEE, J.S. (2017). Ultraviolet B radiation induces impaired lifecycle traits and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat Toxicol*, 184:116-122. Doi: 10.1016/j.aquatox.2017.01.011.
- QIAN, W.; VAN HOUTEN. B. (2010). Alteration in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods*, 51: 452-7. Doi: 10.1016/j.ymeth.2010.03.006.
- RAMÍREZ-DUARE, W.F.; KUROBE, T.; THE, S.J. (2017). Effects of low levels of ultraviolet radiation on antioxidant mechanisms of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosf*, 181: 304-312. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.078.
- REN, L.; ZHANG, C.; TAO, L.; HAO, J.; TAN, K.; MIAO, K.; TIAN, J.; AN, L. (2017). Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes. *J Reproduc Develop*, 63: 247-261. Doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093019.
- ROBINSON, S.A.; ERICKSON III, D.J. (2015). Not just about sunburn—The ozone hole’s profound effect on climate has significant implications for Southern Hemisphere ecosystems. *Glob Chang Bio*, 21: 515–527.

- ROSS, M.J.; STEWART, J.B.; HAGSTROM, E.; FREYER, C.; LAGOUGE, M.; HOFFER, B.J.; OLSON, L.; LARSSON, N.G. (2013). Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature*, 501: 412 – 414. Doi: 10.1038/nature12474
- SANDERMAN, R.; SANDERMAN, D. (1991). Stages in the development of the embryo of the fresh-water crayfish *Cherax destructor*. *Roux Arch Dev Biol*, 200: 27-37.
- SAWYER, D.E.; VAN HOUTEN, B. (1999). Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res*, 434: 161–176.
- SCHRAMM, H.; JARAMILLO, M.; QUADROS, T.; ZENI, E.; MÜLLER, Y.M.R.; AMMAR, D.; NAZARI, E.M. (2017). Effect of UVB radiation exposure in the expression of genes and proteins related to apoptosis in freshwater prawn embryos. *Aquat Toxicol*, Doi: 10.1016/j.aquatox.2017.07.014.
- SCHOLTZ, G. (2000). Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. *J Zool Syst Evol Res*, 38: 175-187.
- SCHUCH, A.P.; MORENO, N.C.; SCHUCH, N.J., MENCK, C.F.M.; GARCIA, C.C.M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med*, 107: 110–124. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029.
- SEKINE, D.; YOULE, R.J. (2018). PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol*, 10: 2. Doi: 10.1186/s12915-017-0470-7.
- SESAKI, H.; JENSEN, R.R. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *Brief Report*, 147: 699.
- SHI Y.; DIERCKX A.; WANROOIJ P.H.; WANROOIJ S.; LARSSON N.G.; WILHELMSSON L.M.; FALKENBERG M.; GUSTAFSSON C.M. (2012). Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery. *Proc Natl Acad Sci*, 109:16510–16515. Doi: 10.1073/pnas.1119738109. 10.1083/jcb.147.4.699.
- SIMÕES-COSTA, M.S.; PACHECO, C.; NAZARI, E.M.; MÜLLER, Y.M.R.; AMMAR, D. (2005). Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Rev Bras Zool*, 22: 501-508. Doi: 10.1590/S0101-81752005000200029.
- SMITH, C.; THUNDATHIL, J.; FILION, F. (2005). Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. *Reprod Ferti. Dev*, 17: 15–22.

- SPIKINGS, E.C.; ALDERSON, J.; JOHN, C. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod*, 76: 327-335.
- QUADROS, T.; SCHRAMM, H.; ZENI, E.C.; SIMIONI, C.; ALLODI, S.; MÜLLER, Y.M.R.; AMMAR, D.; NAZARI, E.M. (2016). Developmental effects of exposure to ultraviolet B radiation on the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi*: Mitochondria as a target of environmental UVB radiation. *Ecotoxicol Environ Safe*, 132: 279-287. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.018.
- RAMIREZ-DUARTE, W.; KUROBE, T.; TEH, S.J. (2017). Effects of low levels of ultraviolet radiation on antioxidant mechanisms of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosf*, 181:304-312. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.078.
- REN, L.; ZHANG, C.; TAO, L.; HAO, J.; TAN, K.; MIAO, J.L. (2017). Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes. *J Reproduc Develop*, 63: 247-261. Doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093019.
- ROWLAND, F.S. (2006). Stratospheric ozone depletion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361: 769-790. Doi: 10.1098/rstb.2005.1783.
- RUSSO, R.; BONAVENTURA, R.; MATRANGA, V. (2014). Time- and dose- dependent gene expression. In sea urchin embryos expose to UVB. *Mar Environ Res*, 93: 85-92. Doi: 10.1016/j.marenvres.2013.08.006.
- SCHUCH, A.P.; LIPINSKI, V.M.; SANTOS, M.B.; SANTOS, C.P.; JARDEM, S.S.; CHECHIN, S.Z.; LORETO, E.L. (2015). Molecular and sensory mechanisms to mitigate sunlight-induced DNA damage in treefrog tadpoles. *J Exp Biol*, 218(Pt 19):3059-67. Doi: 10.1242/jeb.126672.
- SCHUCH, A.P.; MORENO, N.C.; SCHUCH, N.J.; MENCK, C.F.M.; GARCIA, C.C.M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med*, 107: 110-124. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029.
- SHANKLIN, J. (2010). Reflections on the ozone hole. *Nature*, 465: 34-35.
- SINHA, R.P.; HÄDER, D.P. (2002). Life under solar UV radiation in aquatic organisms. *Adv Space Res*, 30 (6): 1546-56.
- SKULACHEV, V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power transmitting cables. *Trends Biochem Sci*, 26: 23-29.

- SOLA, Y.; LORENTE, J. (2015). Contribution of UVA irradiance to the erythema and photoaging effects in solar and sunbed exposures. *J Photoch Photobiol B*, 143: 5-11. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.10.024.
- TILOKANI, L.; NAGASHIMA, S.; PAUPE, V.; PRUDENT, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*, 62 (3): 341-490. Doi: 10.1042/EBC20170104.
- TULAH, A. S., AND BIRCH-MACHIN, M. A. (2013). Stressed out mitochondria: the role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin. *Mitochondrion*, 13: 444–453. Doi: 10.1016/j.mito.2012.11.007.
- TWIG, G.; ELRZA, A.; MOLINA, A.J.; MOHAMED, H.; STILES, L.; HAIGH, S.E.; SHIRIHAI, O.S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J*, 23: 433-46. Doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.
- United Nations Environment Programme (UNEP). (2017). Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: Progress report. Environmental Effects Assessment Panel. *Photochem Photobiol Sci*, 16: 107-145.
- VERNET, M. (2006). Enhanced UV-B radiation in natural ecosystems as an added perturbation due to ozone depletion. *Photochem Photobiol*, 82: 831-833. Doi: 10.1562/2006-05-31-RA-907.
- VIÑA, J.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; BORRAS, C.; FROIO, T.; SANCHIS-GOMAR, F. (2009). Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Advanced Drug Delivery Rev*, 61(14): 1369 – 1374.
- VILLA T.; ANDRI L.; BRASCA F. (1961). Enzymatic research at the mitochondrial level in experimental carbon monoxide poisoning. Behavior of the cytochrome oxidases, aldolases and glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminases in the hepatic and renal mitochondria. *Folia Med. (Napoli)*, 44: 486–495.
- VIRBASIOUS C.A.; VIRBASIOUS J.V.; SCARPULLA R.C. (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev*, 7:2431–2445. Doi: 10.1101/gad.7.12a.2431.
- VIRBASIOUS, J.V., SCARPULLA, R.C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 15: 1309-12.

- WAI, T.; TEOLI, D.; SHOUBRIDGE, A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet*, 40: 1484-1488
- WAI, T.; AO, A.; ZHANG, X.; CYR, D.; DUFORT, D. (2010). The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod*, 83: 52–62
- WAI T.; LANGER T. (2016) Mitochondrial dynamics and metabolic regulation., 27: 105–117. Doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001.
- WALSH, D.W.M.; SIEBENWIRTH, C.; GREUBEL, C.; ILICIC, K.; REINDL, J.; GIRST, S. (2017). Live cell imaging of mitochondria following targeted irradiation in situ reveals rapid and highly localized loss of membrane potential. *Sci Rep*, 7:46684.
- WANG, B.; LIU, P.; TANG, Y.; XU, X.; TANG, R. (2010) Guarding embryo development of zebrafish by shell engineering: a strategy to shield life from ozone depletion. *Plos One*, 5 (4):e9963. Doi: 10.1371/journal.pone.0009963.
- WEBER, T.A.; REICHERT, A.S. (2010). Impaired quality control of mitochondria: Aging from a new perspective. *Experim genontol*, 45: 503-511.
- WESTERMANN, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 872–884.
- WILLIAMS, J.A.; DING, W.X. (2015). A mechanistic review of mitophagy and its role in protection against alcoholic liver disease. *Biomolecules*, 5 (4): 2619-2642.
- WRIGHT, A.; HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. (2003). Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. *Free Radic Biol Med*, 34: 637–647. Doi: 10.1016/S0891-5849(02)01361-8.
- XIE, L.L.; SHI, F.; TAN, Z.; LI, Y.; BODE, A.M.; CAO, Y. (2018). Mitochondrial network structure homeostasis and cell death. *Cancer Sci*. Doi: 10.1111/cas.13830.
- YADAV, P.; SAMADDER, S.R. (2018). Environmental impact assessment of municipal solid waste management options using life cycle assessment: a case study. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25: 838-854. Doi: 10.1007/s11356-017-0439-7.
- YAKES, F.M.; VAN HOUTEN, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 514–519.
- YANG, W. (2011). Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Science*, 20: 1781-1789.

- YOSHII, S.R.; KISHI, C.; ISHIHARA, N.; MIZUSHIMA, N. (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 286: 19630–19640. Doi: 10.1074/jbc.M110.209338
- YOUSHIMITSU, K.; NOCHI, H. (2018). Intra- and intercellular quality control mechanisms of mitochondria. *Cells*, 7:1. Doi: 10.3390/cells7010001.
- YOU, Y.H. (2001). Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem*, 276 (48): 44688–44694.
- YOO, S.M.; JUNG, Y.K. (2018). A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Molecules and Cells*, 41(1): 18.
- YOULE, R.J.; NARENDRA, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12 (1): 9.
- YOULE, R.J.; BLIEK, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337: 1062–1065.
- ZENI, E.C.; AMMAR, D.; LEAL, M.L.; SILVA, H.S.; ALLODI, S.; MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M. (2015). Light-mediated DNA repair prevents UVB-induced cell cycle arrest in embryos of the crustacean *Macrobrachium olfersi*. *Photochem Photobiol*, 91: 869–878. Doi: 10.1111/php.12457.
- ZHAO, C.; ZHANG, L.; SHI, D.; CHI, X.; YIN, D.; SUN, J.; DING, J.; YANG M.; CHANG, Y. (2018). Carryover effects of short-term UV-B radiation on fitness related traits of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Ecotoxicol Environ Safe*, 30: 659–654. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.078.
- ZOROV D.B.; JUHASZOVA M.; SOLLITT S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physio. Rev*, 94: 909–950. Doi: 10.1152/physrev.00026.2013
- ZORZANO, A.; LIESA, M.; SEBASTIAN, D.; SEGALES, J.; PALACIN, M. (2010). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Sem develop biology*, 21: 566–574.