

HELOÍSA SCHRAMM DA SILVA

**ANÁLISE ESPAÇO-TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO APOPTÓTICO EM
EMBRIÕES DE CAMARÃO *Macrobrachium olfersi* EXPOSTOS À
RADIÇÃO ULTRAVIOLETA B**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Biologia Celular e
do Desenvolvimento, do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento, da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Evelise Maria
Nazari

**Florianópolis
2015**

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

Silva, Heloísa Schramm da
Análise espaço-temporal da expressão de proteínas
envolvidas no processo apoptótico em embriões de camarão
Macrobrachium olfersi expostos à Radiação Ultravioleta B /
Heloísa Schramm da Silva ; orientadora, Evelise Maria
Nazari - Florianópolis, SC, 2015.
xviii+54 p.

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Radiação
Ultravioleta B. 3. Células embrionárias . 4. Apoptose. 5.
Crustáceo. I. Nazari, Evelise Maria. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, aos meus pais, Antonio Pedro e Elenita e meu irmão Murilo, pelo amor e incentivo dado para iniciar o Mestrado, além de ser sempre o nosso porto seguro;

À Prof^a Dr^a Evelise Maria Nazari, admirável professora e orientadora, sempre presente e disponível para atender seus orientandos, exemplo de profissional;

À Prof^a Dr^a Yara Müller, pela oportunidade de conviver e por seus conhecimentos repassados;

Ao Prof^o Dr. Dib Ammar pelo auxílio na instalação dos programas necessários à análise dos dados dessa dissertação;

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, por todos os conhecimentos repassados;

Aos colegas de laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, companheiros diários dessa jornada;

À Eliane Zeni, pela amizade, pelos ensinamentos, pela “consultoria” nas dúvidas com os experimentos e pela sua admirável paciência;

À Viviane Glaser, pela amizade e pelo incentivo dado para iniciar o Mestrado;

Aos técnicos dos LAMEBs I e II;

Ao Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo pelo empréstimo da centrífuga;

À agência de fomento CAPES (Edital Ciências do Mar), pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.” (Leonardo da Vinci)

RESUMO

O aumento da incidência da radiação ultravioleta (UV) na superfície terrestre, decorrente, entre outros, da emissão de compostos poluentes na atmosfera e a existência do buraco na camada de ozônio na região Antártica, tem chamado atenção dos pesquisadores. A radiação UV mais danosa aos seres vivos é a radiação ultravioleta B (UVB). Os ambientes aquáticos, assim como os terrestres, estão sujeitos à incidência dessa radiação, porém poucos trabalhos têm elucidado os efeitos celulares provocados pela radiação UVB nos organismos que habitam estes ambientes. Dentre os muitos efeitos celulares da radiação UVB está a indução à apoptose, que no desenvolvimento embrionário desempenha um papel importante de controle do número celular. O objetivo deste trabalho foi caracterizar espacialmente e temporalmente a expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico induzido pela radiação UVB durante a morfogênese e organogênese iniciais, utilizando embriões do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* como modelo de estudo (autorização IBAMA - 15294/1). Assim, foi simulado, em laboratório, a irradiação UVB (310 mW/cm^2) que os embriões recebem durante a época de reprodução no ambiente natural. Fêmeas ovígeras, com embriões em E6, foram irradiados usando uma lâmpada UVB 6W por 30 min. Após a irradiação, os embriões foram mantidos no escuro por 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 20 h. Embriões em E6 e E7 não irradiados foram utilizados como controle. Os resultados obtidos sugerem que a radiação UVB induz, em embriões de *M. olfersi*, a ocorrência de apoptose através do recrutamento inicial de proteínas relacionadas às vias intrínsecas, desencadeada por dano ao DNA e também pela ativação de proteína pró-apoptótica Bak, devido a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial. Posteriormente foi observado um aumento da proteína Fas, que atua como receptor de morte na sinalização da via extrínseca. A ocorrência de apoptose não se restringiu a uma região embrionária específica. Este trabalho permitiu caracterizar espacial e temporalmente a expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico em embriões de *M. olfersi*, contribuindo assim para a compreensão deste processo em células embrionárias de invertebrados e dessa forma contribuir também para o conhecimento atual sobre o impacto da radiação UVB nos organismos aquáticos.

Palavras-chave: radiação UVB; células embrionárias; apoptose; crustáceo; ambiente aquático.

ABSTRACT

The increase of ultraviolet radiation (UV) on Earth's surface, due to the emissions of pollutant compounds in the atmosphere and the existence of the ozone hole in the Antarctic region, have attracted the attention of researchers. The most harmful spectrum of UV radiation to organisms is ultraviolet B radiation (UVB). The aquatic, as well as, the terrestrial environments are subject to incidence of this radiation, but few studies have elucidated the cellular effects caused by UVB radiation in organisms that inhabit these environments. Among the multiple cellular effects of UVB radiation is the induction to apoptosis that plays an important role in embryonic development on control of the cellular number. The aim of this study was to spatially and temporally characterize the expression of proteins involved in the apoptotic process induced by UVB radiation during early morphogenesis and organogenesis, using embryos of freshwater *Macrobrachium olfersi* as a model (IBAMA authorization - 15294/1). Thus, the UVB irradiation (310 mW/cm^2) that embryos receive during the breeding season in the natural environment was simulate in the laboratory. Ovigerous females with embryos at E6 were irradiated using a UVB lamp 6W for 30 min. After irradiation, the embryos were kept in darkness for 4 h, 6 h, 8 h, 12 h and 20 h. Non-irradiated embryos at E6 and E7 were used as controls. The obtained results suggest that UVB radiation induces in *M. olfersi* embryos the occurrence of apoptosis, through the initial recruitment of proteins related to intrinsic pathways, triggered by DNA damage and also by the activation of pro-apoptotic protein Bak, due to changes in permeability of mitochondrial membrane. After, was observed a increase in Fas proteins that acts a death receptor in the extrinsic pathway signaling. The occurrence of apoptosis was not restricted to a specific embryonic region. This work allows to characterize spatial and temporally the expression of proteins involved on apoptotic process in *M. olfersi* embryos, contributing to the understand of this process in embryonic cells of invertebrates, and thereby contribute to the current knowledge about the impact of UVB radiation on aquatic organisms.

Keywords: UVB radiation; embryonic cells; apoptosis; crustacean; aquatic environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática resumida das vias apoptóticas e de algumas proteínas envolvidas no processo apoptótico	6
Figura 2: Representação esquemática de fêmea ovígera de <i>M. olfersi</i>	7
Figura 3: Embrião em E6 de <i>M. olfersi</i> destacando as regiões embrionárias	12
Figura 4: Representação esquemática do desenho experimental adotado para investigar o efeito da radiação UVB em embriões de <i>M. olfersi</i>	13
Figura 5: Marcações de células apoptóticas em embriões de <i>M. olfersi</i> pelo método de TUNEL	19
Figura 6: Imunomarcção para identificação da proteína p53 em embriões de <i>M. olfersi</i>	20
Figura 7: Análise por citometria de fluxo da proteína p53 em embriões de <i>M. olfersi</i>	21
Figura 8: Imunomarcção para identificação da proteína Bak em embriões de <i>M. olfersi</i>	22
Figura 9: Análise por citometria de fluxo da proteína Bak em embriões de <i>M. olfersi</i>	23
Figura 10: Imunomarcção para identificação da proteína Bcl 2 em embriões de <i>M. olfersi</i>	24
Figura 11: Análise por citometria de fluxo da proteína Bcl 2 em embriões de <i>M. olfersi</i>	25
Figura 12: Imunomarcção para identificação da proteína Fas em embriões de <i>M. olfersi</i>	26
Figura 13: Análise por citometria de fluxo da proteína Fas em embriões de <i>M. olfersi</i>	27
Figura 14: Imunomarcção para identificação da proteína Caspase 8 em embriões de <i>M. olfersi</i>	28
Figura 15: Análise por citometria de fluxo da proteína Caspase 8 em embriões de <i>M. olfersi</i>	29
Figura 16: Imunomarcção para identificação da proteína Caspase 3 em embriões de <i>M. olfersi</i>	30
Figura 17: Análise por citometria de fluxo da proteína Caspase 3 em embriões de <i>M. olfersi</i>	31
Figura 18: Análise por citometria de fluxo das proteínas envolvidas no processo de apoptose em embriões de <i>M. olfersi</i> expostas à radiação UVB.....	32

Figura 19: Análise por citometria de fluxo das proteínas envolvidas no processo de apoptose em embriões de <i>M. olfersi</i> expostas à radiação UVB	33
Figura 20: Resumo gráfico do efeito da radiação UVB sobre proteínas envolvidas na apoptose em embriões de <i>M. olfersi</i>	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Relação dos anticorpos primários utilizados nas marcações celulares por imuno-histoquímica e citometria de fluxo ...	16
Quadro 2: Relação dos anticorpos secundários utilizados nas marcações celulares por imuno-histoquímica e citometria de fluxo	17
Quadro 3: Resumo dos resultados obtidos para cada proteína em relação ao tempo de análise após a irradiação com UVB	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Apêndices
CFCs	Clorofluorocarbonos
BFCs	Bromofluorocarbonos
DAB	3, 3' diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
E	dia embrionário
EROs	espécies reativas de oxigênio
EGTA	ácido tetracético glicol etileno, do inglês <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
FITC-A	isotiocianato de fluoresceína, do inglês <i>fluorescein isothiocyanato</i>
FSC-A	definição para o parâmetro tamanho, do inglês <i>forward scatter</i>
HE	hematoxilina e eosina
H	hora(s)
LO	lobo óptico
Min	Minutos
NA	densidade numérica de células por área
PC	papila caudal
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PIPES	piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico
PEM-FA	fixador piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico, ácido tetracético glicol etileno, sulfato de magnésio, formaldeído
PBS	tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
SFB	soro fetal bovino
SSC-A	definição para o parâmetro complexidade, do inglês <i>side scatter</i>
TBS	tampão Tris salino, do inglês <i>Tris-buffered saline</i>
TUNEL	terminal transferase dUTP Nick end labeling, do inglês <i>transferase terminal dUTP nick end labeling</i>
UV	Ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
UVC	ultravioleta C
V	Vitelo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Radiação Ultravioleta e a Camada de Ozônio	1
1.2 Efeitos da UVB nos organismos aquáticos.....	2
1.3 Apoptose e a radiação UVB	4
1.4 Embriões de <i>Macrobrachium olfersi</i> como modelo de estudo	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. METODOLOGIA	11
3.1 Obtenção dos embriões	11
3.2 Estagiamento dos embriões	11
3.3 Procedimento de irradiação	12
3.4 Definição dos grupos experimentais	13
3.5 Fixação e inclusão dos ovos para análise em microscopia de luz ...	14
3.6 Identificação de células apoptóticas pelo método de TUNEL.....	14
3.7 Marcações celulares por imunohistoquímica	15
3.8 Marcações celulares por citometria de fluxo	17
3.9 Análise de dados.....	18
3.10 Análise estatística	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Efeito da radiação UVB sobre a indução a apoptose.....	19
4.2 Efeito da radiação UVB sobre a expressão das proteínas envolvidas no processo apoptótico	20
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Radiação Ultravioleta e a Camada de Ozônio

A radiação ultravioleta (UV) faz parte do espectro eletromagnético solar e é um componente importante para diversos processos fisiológicos nos seres vivos, dentre os quais podemos mencionar a fotossíntese (Paul e Gwynn-Jones, 2003; Baroniya et al., 2014), a orientação visual de espécies de invertebrados e vertebrados (Dong et al., 2007) e a síntese de vitamina D em humanos (Godar et al., 2012). A radiação UV está classificada de acordo com seu comprimento de onda e seus efeitos fotobiológicos, em: ultravioleta A I (UVAI, 400-340 nm), ultravioleta A II (UVAII, 340-320 nm), ultravioleta B (UVB, 320-290 nm) e ultravioleta C (UVC, 290-200 nm) (Diffey, 1991; 2002).

A radiação UV chega com intensidade diferenciada na superfície terrestre. Cerca de 90 a 95% da radiação UVA emitida pelo sol atinge à atmosfera terrestre, pois a camada de ozônio atenua apenas parte dessa radiação (D'orazio et al., 2013). A radiação UVA é responsável pelo envelhecimento precoce da pele (Gallagher e Lee, 2006) e aparecimento de eritemas (Ichihashi et al., 2003). A radiação UVC é altamente energética e tem ação esterilizante, mas não atinge a superfície terrestre, pois é praticamente toda atenuada na camada de ozônio na estratosfera (Hockberger, 2002).

A radiação UVB é a mais danosa aos seres vivos apesar de, apenas cerca de 5 a 10% atingir a superfície terrestre (Pfeifer et al., 2005). Os principais efeitos nocivos atribuídos à UVB são mencionados em estudos realizados com tecidos de mamíferos (Marrot e Meunier, 2008; Nicolaou et al., 2011; Widel et al., 2014; Zeng et al., 2014), incluindo humanos (Young, 2006; Mouret et al., 2008; Timares et al., 2008; Hachiya et al., 2009; Polefka et al., 2012). A grande maioria dos estudos trata da exposição UVB em humanos, mas esta radiação, dependendo da dose recebida, também ocasiona alterações na fisiologia, bioquímica, reprodução e crescimento de animais vertebrados (Kumar e Joshi, 1992; Lesser et al., 2001; Onicx et al., 2010) e invertebrados (Gouveia et al., 2005; Przeslawski, 2005; Dahms e Lee, 2010; Rathjen et al., 2012). A radiação UVB é responsável ainda por outros efeitos nocivos, que incluem doenças como a catarata e câncer de pele, além de causar deficiência no sistema imunológico (Kirchhoff e Echer, 2001; Mahmoud et al., 2009; Dupont et al., 2013; Sola e Lorente, 2015).

Como mencionado anteriormente, a radiação UV que chega na superfície terrestre é atenuada pela camada de ozônio. No entanto, a distribuição do ozônio é irregular e muito dinâmica. A presença da radiação UV desencadeia um processo natural, que leva à contínua formação e dissociação da molécula de ozônio na estratosfera (Rowland, 2006). Porém, nos últimos 40 anos, esta camada vem apresentando alterações em sua estrutura, devido, principalmente, às emissões de compostos, como clorofluorocarbonos (CFCs) e bromofluorocarbonos (BFCs) decorrentes da atividade humana (Smith et al., 1992). Na dinâmica de formação e dissociação do ozônio, a radiação UV quebra as ligações químicas da molécula de ozônio (O_3), resultando na liberação do átomo de oxigênio (O) e da molécula de oxigênio (O_2). Quando o O_2 livre se liga a moléculas de cloro ou bromo, formando novos compostos, impede a formação de uma nova molécula de ozônio (Casiccia et al., 2003; Maione et al., 2013). Essa alteração acarreta em uma diminuição de moléculas de ozônio disponíveis e, conseqüentemente rarefação da camada de ozônio, provocando o aumento da incidência da radiação UV na superfície terrestre. Além disso, constata-se a existência do chamado “buraco na camada de ozônio” na região Antártica (Kirchhoff et al., 1996; Shanklin, 2010), que igualmente contribui para o aumento da UVB na superfície terrestre, sobretudo na região sul da América do Sul, onde os índices desta radiação têm se mostrado muito elevados, principalmente nos meses de primavera e verão (Orce e Helbling, 1997; Díaz et al., 2006; Schuch et al., 2006; Gonzalez et al., 2014; Previdi e Polvani, 2014).

1.2 Efeitos da UVB nos organismos aquáticos

Embora a grande maioria dos estudos, a respeito dos efeitos da radiação UV, abordar pesquisas com humanos, eles não são os únicos organismos a serem afetados. Os organismos aquáticos também podem ser comprometidos quando expostos à radiação UV. Efeitos fotobiológicos da radiação UVB foram reconhecidos em profundidades de até 30 metros de coluna d’água, contudo depende da transparência da água (Karentz e Lutze, 1990). A turbidez da água é um fator que modifica a incidência da radiação que penetra na água, já que as partículas em suspensão também atenuam essa radiação incidente e podem amenizar a irradiância recebida nos ambientes aquáticos (Dunne e Brown, 1996; Herndl et al., 1999). Considerando que espécies aquáticas podem ser afetadas pela radiação UVB incidente é importante ressaltar que muitas delas não possuem estruturas de proteção, como conchas ou

realizam comportamentos, como o de migração vertical na coluna da água. Desse modo, esses animais podem ser mais afetados, já que estão diretamente expostos à radiação UV (Häder et al., 2011).

De um modo geral, os embriões são mais susceptíveis à radiação UV do que as larvas e os indivíduos adultos, pois os embriões apresentam mecanismos de defesa não totalmente desenvolvidos (Epel, 2003). Embora esse conhecimento seja consolidado, nos estudos com animais aquáticos poucas são as pesquisas que enfocam os efeitos da radiação UVB nos estágios iniciais do ciclo de vida.

Trabalhos com vertebrados aquáticos, que abordam a radiação UVB no desenvolvimento, são relacionados à sobrevivência de larvas de anfíbios (Tietge et al., 2001), e diminuição da taxa de crescimento em larvas de peixes (Fukunishi et al., 2013). Já para os embriões de invertebrados expostos à radiação UVB, essas pesquisas são mais escassas ainda e, em sua maioria, referem-se aos que vivem em ambientes marinhos, enfocando por exemplo, a mortalidade de juvenis em moluscos (Ruelas et al., 2006) e alterações no comportamento de larvas de caranguejos (Hovel e Morgan, 1999).

Trabalhos que abordam embriões de organismos aquáticos expostos à radiação UVB se restringem aos estudos dos efeitos no comportamento e na sobrevivência. A maioria deles não menciona as causas celulares desses eventos. Porém, a radiação UVB também pode induzir alterações, como estresse oxidativo, em embriões de copépodes (Won et al., 2014; Kim et al., 2015).

Um número mais reduzido de pesquisas relacionadas com a exposição à radiação UVB são realizados com embriões de crustáceos. Trabalhos com embriões de micro-crustáceos de água doce, sob efeito da radiação, resultaram em atraso no desenvolvimento de *Daphnia* (Connelly et al., 2009) e foram verificados danos na morfologia e alterações celulares em embriões de camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Nazari et al., 2010; 2013).

Considerando os efeitos no comportamento e na sobrevivência de embriões de organismos aquáticos, a radiação UVB também pode levar a alterações celulares e moleculares, como constatado nos embriões de camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Nazari et al., 2010; 2013). Estudos realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/ BEG/CCB/UFSC identificaram dano ao DNA, com formação de dímeros de pirimidina ciclobutano em embriões dessa espécie (Zeni, 2013). Além de danos no núcleo, a exposição à radiação UVB pode levar a alterações no citoplasma, com formação de

espécies reativas de oxigênio (EROs), como verificado em larvas de peixes (Carrasco-Malio et al., 2014).

Conforme os trabalhos mencionados acima, é possível verificar que mecanismos moleculares dos sistemas de defesa são desencadeados em resposta à radiação UVB, que age tanto no citoplasma, como no núcleo, onde tem como alvo o DNA (Yang, 2011). Dessa forma, além dos danos ao DNA, causados pela incidência da radiação UVB, outros efeitos desfavoráveis podem ser provocados nas células dos organismos expostos, como por exemplo, induzir o processo de morte celular por apoptose (Pietenpol e Stewart, 2002; Franco et al., 2009; Dahms e Lee, 2010).

1.3 A apoptose e a Radiação UVB

A necrose e a apoptose são dois tipos de morte celular conhecidos e consolidados na literatura. A necrose ocorre quando acontece dano patológico e são ativadas as defesas do sistema imunológico. Na morte por necrose as organelas celulares aumentam de volume e se rompem, liberando o conteúdo citoplasmático no espaço intersticial, desencadeando um processo inflamatório (Jacobson et al., 1997). A apoptose, diferentemente da necrose, é um tipo de morte celular programada e requer síntese de RNA e de proteínas, que induzem na célula, uma série de alterações morfológicas e fisiológicas. Essas alterações têm como características: a condensação da cromatina, a desorganização do citoesqueleto e a contração do núcleo e citoplasma da célula. A membrana plasmática se mantém íntegra, evitando o extravazamento do conteúdo celular. Nas etapas seguintes, a membrana plasmática engloba os resíduos celulares formando corpos apoptóticos, que são fagocitados por outras células (Opferman e Korsmeyer, 2003; Roos e Kaina, 2006; Chi et al., 2014).

A palavra apoptose tem origem no idioma grego que significa “decaimento”. O termo foi usado pela primeira vez no início dos anos 70 pelos patologistas John Kerr, Andrew Wylie e Alaister Currie, que descrevem a apoptose como sendo um processo de morte da célula que é regulado por ela mesma através de alterações morfológicas distintas de outros tipos de morte celular (Kerr et al., 1972; Elmore, 2007). Diversas proteínas estão envolvidas em três vias específicas que coordenam as cascatas de eventos no processo de morte celular por apoptose. Dentre essas vias, duas são denominadas intrínsecas, sendo uma delas ativada em decorrência de danos ao DNA e outra ativada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs); e, a terceira via, denominada

extrínseca, ativada por receptores transmembrana na superfície celular, como Fas/Fadd (Doseff, 2004) (Figura 1).

A via intrínseca, ativada em decorrência de dano ao DNA, é desencadeada pelo aumento da proteína p53 no núcleo. Na tentativa de impedir a propagação do dano, bem como, da progressão do ciclo celular a p53 ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, mediados pela proteína p21 e PCNA (do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*) (Peters et al., 2003). Neste caso, se o processo de reparo ao dano não for eficiente, a proteína p53 desencadeia a ativação de proteínas pró-apoptóticas, como Bak, Bad e Bax que alteram o potencial de membrana mitocondrial (Chi et al., 2014). A outra via intrínseca tem início com o aumento da formação de EROs no citoplasma, que leva à peroxidação lipídica, desencadeando também alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial. Com o potencial de membrana alterado em ambas as vias, haverá liberação de citocromo *c* e ativação das caspases 9 e 3 (Franco et al., 2009). No entanto, a apoptose poderá não ocorrer quando proteínas anti-apoptóticas da família Bcl 2, que mantêm o potencial de membrana mitocondrial, estiverem superexpressas (Opferman e Korsmeyer, 2003).

A via extrínseca apoptótica é independente da sinalização de dano ao DNA. A radiação UVB induz, nessa via, a ativação dos receptores de morte na superfície celular e a partir desse sinal são acionadas, no citoplasma, as clivagens das caspases 8, que por sua vez ativam as caspases 3. A ativação da Caspase 3, chamada também de caspase efetora, promove a sinalização de outras proteínas que iniciam a fragmentação do DNA (Kruidering e Evan, 2000; Hail et al., 2006).

É importante salientar que a apoptose é um processo natural, necessário ao bom funcionamento do organismo e igualmente fundamental para o desenvolvimento embrionário, durante os processos de morfogênese e organogênese (Elmore, 2007). Este tipo de morte é induzido, tanto por sinais celulares próprios do organismo, quanto em resposta a fatores externos, como tratamentos com quimioterápicos ou ação da radiação UV (Godar, 1996; Widel et al., 2014). No último caso, a célula desencadeia a apoptose para que o dano causado pela radiação não seja repassado para as células filhas, podendo causar prejuízo às funções de tecidos e órgãos e, talvez, comprometer o indivíduo como um todo (Doseff, 2004; Feng et al., 2012).

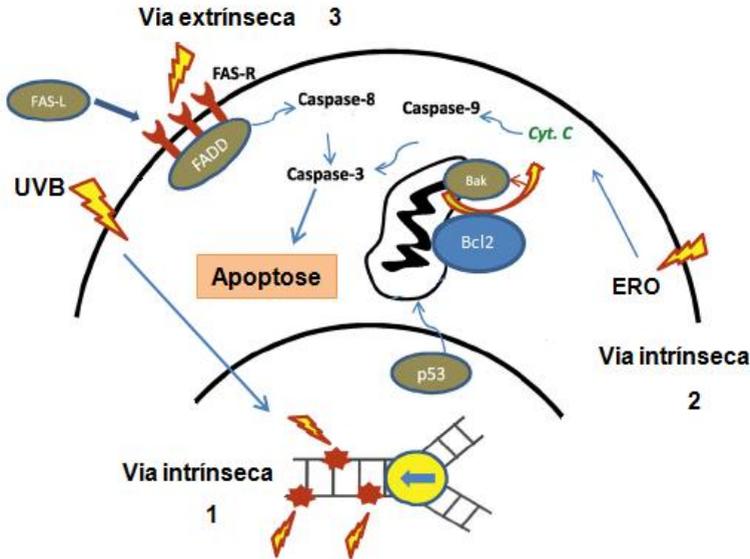


Figura 1: Representação esquemática resumida das vias apoptóticas e de algumas proteínas envolvidas no processo apoptótico. 1, Via apoptótica intrínseca ativada em decorrência de dano ao DNA. 2, Via apoptótica intrínseca ativada por geração de EROs e 3, Via apoptótica extrínseca ativada por receptores de membrana. Fonte: adaptado de Batista et al., 2009.

Conforme mencionado no item anterior, poucos estudos têm abordado que, o aumento da incidência de radiação UVB vem apresentando respostas celulares a várias espécies de organismos, dentre eles, os invertebrados aquáticos. Embora as vias apoptóticas, sucintamente descritas anteriormente, sejam bem conhecidas em vertebrados, os trabalhos que enfocam essas vias, sob indução da radiação UVB em embriões de invertebrados, são pouco elucidadas. O conhecimento existente acerca dos mecanismos moleculares de indução à apoptose em invertebrados resume-se em estudos com a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster* (Zhou e Steller, 2003), o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Lant e Derry, 2013) e o ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Campanale et al., 2011). Contudo, esses mecanismos podem diferir em crustáceos, uma vez que Menze e colaboradores (2010) demonstraram maior diversidade de proteínas da família Bcl 2 em crustáceos do que em *D. melanogaster*.

1.4 Embriões de *Macrobrachium olfersi* como modelo de estudo

No presente estudo foram utilizados embriões do camarão de água doce da espécie *Macrobrachium olfersi* como modelo biológico. Esta espécie desempenha importante papel na dinâmica dos ambientes aquáticos de água doce, sendo a mais abundante e frequente na Ilha de Santa Catarina (Müller et al., 1999; Nazari et al., 2003).

Em ambiente natural, a espécie está exposta a radiação UVB, pois habita águas rasas (Ammar et al., 2001), onde esta radiação penetra com facilidade (Nazari et al., 2010). As fêmeas de *M. olfersi* transportam os ovos em uma câmara incubadora localizada na região ventral do abdome, de modo que, se pode supor que os embriões estão sujeitos a mesma intensidade de radiação UVB do ambiente (Figura 2). Além disso, a fêmea realiza comportamentos frequentes de aeração, que contribuem para a movimentação dos ovos, de modo que os mesmos ficam expostos à radiação UVB incidente. Por ser externa, e desprovida de carapaça, a câmara incubadora permite a retirada de ovos diariamente para acompanhamento sistemático do desenvolvimento embrionário em laboratório.

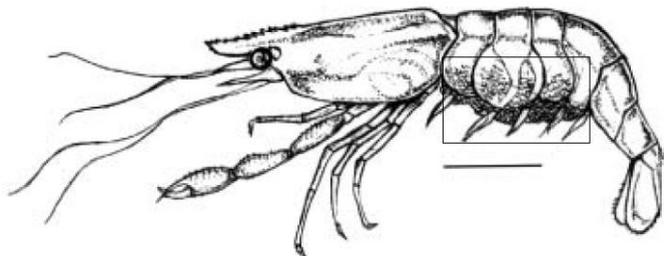


Figura 2: Esquema representativo de fêmea ovígera de *M. olfersi*. Área em destaque mostra a localização da câmara incubadora e dos ovos. Barra de escala = 1 cm. Adaptado de: Nazari et al., 2003.

Os ovos de *M. olfersi* são pequenos, com formato elíptico e, nos estágios iniciais, têm tamanho médio de 0,38 mm no maior eixo e 0,47 mm no menor eixo (Nazari et al., 2003), sendo o período de desenvolvimento embrionário relativamente curto, de 14 dias (Simões-Costa et al., 2005). Alterações morfológicas em embriões de *M. olfersi* coletados na natureza são semelhantes àsquelas encontradas na irradiação simulada em laboratório (Nazari et al., 2010). É importante salientar que a estação reprodutiva de *M. olfersi* ocorre durante os meses de verão,

quando os níveis de radiação UVB atingem índices máximos na região da Ilha de Santa Catarina.

O aumento da incidência da radiação UVB nos ambientes terrestres e aquáticos constitui-se de um problema atual e de grande importância, o qual está intimamente relacionado às mudanças climáticas globais. Por isso, é fundamental compreender os efeitos causados nos embriões dessa espécie, já que a maioria dos trabalhos sobre o efeito da radiação em crustáceos é realizada com espécies marinhas. Poucas abordagens tratam de ambientes de água doce e, além disso, os estudos realizados enfocam basicamente os efeitos sobre a sobrevivência, ritmo de desenvolvimento e taxa de eclosão dos embriões, sem elucidar as causas celulares destes eventos. Mesmo que os mecanismos moleculares de morte celular programada sejam conservados evolutivamente (Menze et al., 2005), não se sabe se estão presentes também em crustáceos e se as vias apoptóticas são mantidas e ativadas como nos mamíferos. Portanto, estudos mais aprofundados são necessários para investigar essas vias na indução da apoptose pela radiação UVB em embriões de *M. olfersi*.

Finalmente, considerando a crescente incidência da radiação UVB nos ambientes terrestres e aquáticos, a temática deste trabalho justifica-se por sua abrangência ambiental e pela geração de resultados que possam contribuir para o entendimento dos impactos que a radiação UVB pode acarretar na biodiversidade. Os efeitos nocivos da radiação UVB em tecidos e células humanas são conhecidos, porém não se conhece ainda a amplitude dos efeitos dos elevados índices de UVB nos diferentes sistemas biológicos. Deste modo, a realização de estudos que enfoquem o efeito de diferentes estressores durante o desenvolvimento embrionário é de relevância para as áreas de biologia do desenvolvimento e embriotoxicidade, pois alterações induzidas nas células embrionárias podem comprometer a viabilidade dos embriões, das larvas e de juvenis. Assim, a hipótese levantada neste estudo é a de que a radiação UVB ativa simultaneamente as vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose em embriões de *M. olfersi*. Mais especificamente, a radiação UVB ativa a via apoptótica intrínseca nuclear por dano ao DNA, classicamente referenciada em espécies de mamíferos e ainda interfere na expressão das proteínas Bak e Bcl 2 relacionadas à via intrínseca citoplasmática, bem como interfere na expressão do receptor de morte celular Fas, na via extrínseca.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito da radiação UVB sobre a indução à apoptose, analisando espacialmente e temporalmente a expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico durante a morfogênese e organogênese iniciais em embriões do camarão de água doce *M. olfersi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Diagnosticar a ocorrência de apoptose nas células embrionárias de *M. olfersi* irradiados com UVB e não irradiados;
- Investigar a expressão das proteínas p53, Fas, Bcl 2, Bak, Caspase 8 e Caspase 3 envolvidas no processo apoptótico nas diferentes regiões embrionárias de *M. olfersi*;
- Analisar a expressão das proteínas de interesse nos intervalos de 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 20 h após a irradiação com UVB;
- Propor, através do padrão da expressão das proteínas investigadas, as prováveis vias apoptóticas desencadeadas pela radiação UVB em embriões de camarão de água doce *M. olfersi*.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção dos embriões de *M. olfersi*

Os embriões de *M. olfersi* utilizados neste estudo foram obtidos por meio da reprodução dos camarões mantidos em aquários no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB/UFSC. Para a manutenção do plantel de reprodutores foram realizadas coletas de fêmeas e machos adultos no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Florianópolis/SC (Autorização Permanente IBAMA nº 15294-1) durante os anos de 2013 e 2014. Os animais coletados foram transportados em aquários portáteis de 16 L para o Laboratório. Os mesmos foram mantidos em condição de aeração constante, por aproximadamente 3 h, até a transferência para o aquário definitivo. O manejo para o aquário definitivo foi realizado banhando os animais com água de outro aquário, para evitar a contaminação por microbiota oriunda do ambiente lacustre e, em seguida, foram realocados para o aquário definitivo de 40 L. No aquário, foram mantidos em condições de aeração constante, temperatura de 24°C (± 1), fotoperíodo de 12 h claro, utilizando lâmpada fluorescente com irradiação de luz visível de 96 mW/cm² (Philips TLT 40 W/ 75 RS). Os animais foram alimentados com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish®). Para viabilizar a realização de cópula e a obtenção de fêmeas ovíferas, os camarões foram mantidos na proporção de 1 macho: 3 fêmeas.

3.2 Estagiamento dos embriões

Amostras de ovos foram retiradas de fêmeas ovíferas obtidas em aquário para a realização do estagiamento dos embriões. Com o auxílio de uma pinça, amostras com cerca de 20 ovos foram removidas das fêmeas e visualizadas em estereomicroscópio (Olympus SHZ10, 35X a 70X) para identificar o estágio do desenvolvimento, conforme estagiamento por dia embrionário (E), estabelecido por Simões-Costa e colaboradores (2005). Cada dia embrionário corresponde a um período de 24 h de desenvolvimento. As fêmeas cujos embriões estavam no 6º dia de desenvolvimento embrionário (E6) foram selecionadas para este trabalho.

Em E6 o embrião está praticamente na metade do seu desenvolvimento, que se estende até o 14º dia (E14). As características morfológicas que permitem identificar o embrião em E6 são: presença

dos lobos ópticos próximos a uma das extremidades do ovo, apêndices naupliares, apêndices pós-naupliares e papila caudal encurvada sobre si mesma na extremidade oposta aos lobos ópticos, o que confere ao embrião o formato da letra C (Figura 3).

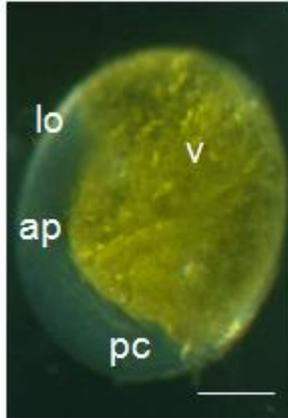


Figura 3: Embrião em E6 de *M. olfersi* destacando as regiões embrionárias. v, vitelo; lo, lobo óptico; ap, apêndices; pc, papila caudal. Barra de escala = 0,2 mm.

Neste estudo, a escolha do estágio embrionário E6 deve-se ao fato de que, nesta idade, o embrião está no início dos processos de morfogênese e organogênese. Nesse momento do desenvolvimento ocorre intensa proliferação de células e diferenciação celular, bem como aumento da complexidade das estruturas embrionárias. Sendo assim, mecanismos celulares relacionados à formação do embrião, como a apoptose, podem ser investigados.

3.3 Procedimento de irradiação

As fêmeas ovígeras, com ovos em E6 foram transferidas para aquário de 16 L, desprovido de abrigo, equipado com lâmpada UVB de 6 W (Vilber Lourmat) e então irradiadas por 30 min. A irradiância utilizada de 310 mW/cm^2 UVB simula, de acordo com Nazari e colaboradores (2010), a irradiância natural a qual as fêmeas estão expostas durante a estação reprodutiva (Müller et al., 1999; Ammar et al., 2001).

3.4 Definição dos grupos experimentais

Amostras de ovos das fêmeas ovígeras foram retiradas nas primeiras 20 h após a irradiação, nos intervalos de 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 20 h (Figura 4). Para o grupo controle foram utilizados embriões não-irradiados em E6 e E7, que correspondem ao estágio do momento da irradiação e ao estágio próximo às 20 h após a irradiação, respectivamente. Para fins de comparação entre os grupos estudados na análise da marcação de células por citometria de fluxo, optou-se por comparar o controle E6 com as primeiras 12 h após a irradiação, ou seja, com os grupos de 4 h, 6 h, 8 h e 12 h e o controle E7 foi comparado com o grupo de 20 h após a exposição com UVB.

A definição das horas dos grupos experimentais foi baseada no conhecimento atual de que a apoptose induzida por um insulto ocorre no intervalo de 24 h. Assim, para poder acompanhar o comportamento de proteínas envolvidas no processo apoptótico foram estabelecidos intervalos nas primeiras 24 h após insulto da radiação UVB.

As amostras dos embriões foram destinadas para análises em microscopia de luz (coloração HE e imuno-histoquímica), método de TUNEL e citometria de fluxo.

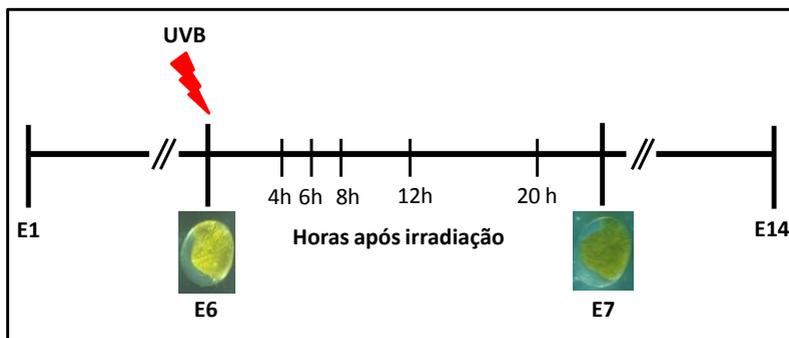


Figura 4: Representação esquemática do desenho experimental adotado para investigar o efeito da radiação UVB em embriões de *M. olfersi*. Destaque para os tempos pós-irradiação analisados. // representa a quebra na escala de tempo no desenvolvimento de *M. olfersi*.

3.5 Fixação e inclusão dos ovos para análise em microscopia de luz

Aproximadamente 50 ovos foram fixados em solução PEM-FA (tampão PIPES 0,1 M + EGTA 2,0 mM + MgSO₄ 1,0 mM + formaldeído a 3,7%, pH 6,9) (Scholtz et al., 1994) por 30 min, à temperatura ambiente e em agitador tipo gangorra. Após a fixação, as amostras foram mantidas em tampão fosfato salino [PBS, do inglês *phosphate buffered saline*, composto por 77 mM de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e 22 mM de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄)/L], pH 7,4 a 4°C por no máximo 48 h. Em seguida, foram submetidas a banhos em solução crioprotetora de sacarose a 5% e 15% por 3 h e em solução de sacarose a 30% por 24 h, todos mantidos a 4°C. Após isto, seguiu-se com o procedimento de inclusão em meio Tissue Tek® a -25°C, sendo obtidas secções seriadas, na espessura de 6 µm, em micrótomo criostato Leica CM 1850 UV, no Laboratório Multiusuário II (LAMEB II) do CCB/UFSC. As secções foram montadas em lâminas tratadas com poli-L-lisina e armazenados a 4°C. Em cada lâmina foram dispostas secções dos grupos controle e irradiados, de forma que, ambos receberam o mesmo tratamento durante a realização do procedimento de coloração, imuno-histoquímica e TUNEL. Para controle histológico e verificação da integridade dos tecidos e das células foi realizada coloração com Hematoxilina-Eosina (HE).

3.6 Identificação de células apoptóticas pelo método de TUNEL

Para esta análise foram utilizados os reagentes do *kit* TdT FragELTM DNA *Fragmentation Detection* (Calbiochem®), seguindo-se as recomendações do fabricante, as quais foram adaptadas conforme descrito a seguir. As lâminas foram imersas em 3 banhos de água corrente por 3 min cada, para a remoção do meio de montagem Tissue Tek®. Em seguida, foram lavadas com tampão Tris salino (TBS, do inglês *Tris Buffered Saline*), 0,1 M, pH 7,4. A permeabilização das membranas celulares foi feita com proteinase K diluída em tampão Tris 10 mM, pH 8,0 (na diluição de 1:400). Após esse procedimento, as secções foram lavadas com TBS 20 mM. Para o bloqueio das peroxidases endógenas, as secções foram cobertas com peróxido de hidrogênio: metanol (1:2) por 5 min e lavadas com TBS 0,1 M. Para a reação de equilíbrio e marcação, as secções foram incubadas com a enzima de marcação do TUNEL a 37° C em câmara úmida por 1 h e 30 min. A detecção das marcações foi feita com solução de detecção fornecida pelo fabricante, por 30 min. Após esse procedimento, as

secções foram reveladas com DAB® (3,3'diaminobenzidina) e, posteriormente, lavadas com água destilada por 10 min, contracorados com verde de metila e montados com Entellan®.

3.7 Marcações celulares por imuno-histoquímica

Para as marcações das proteínas envolvidas no processo apoptótico por imuno-histoquímica, as lâminas foram imersas em 3 banhos de água corrente, por 3 min cada, para a remoção do meio de montagem Tissue Tek®. Após, as secções foram tratadas com peróxido de hidrogênio: metanol a 100% (1:2), por 10 min, para a inativação das peroxidases endógenas, seguidos de 2 banhos em PBS [composto por 500 mM de cloreto de sódio (NaCl) + 3 mM de cloreto de potássio (KCl) + 1 mM de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e 12 mM de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄/L) pH 7,4, por 10 min. A permeabilização das membranas celulares foi realizada com solução de PBS (1 M, pH 7,4) + Triton X-100 a 0,3% por 15 min. Para a inativação dos sítios inespecíficos, as secções foram tratadas com solução PBS + Triton X-100 a 0,3% com soro fetal bovino (SFB) a 5% por 30 min. Em seguida, as secções foram incubadas durante 12 h, com anticorpos primários, na diluição de 1:100 (Quadro 1), a 4°C. Após, as secções foram lavadas por 6 vezes durante 5 min com PBS + Triton X-100 a 0,3% e incubados com anticorpos secundários na diluição de 1:200 durante 3 h à temperatura ambiente (Quadro 2). As secções foram lavadas com PBS e para a amplificação das marcações, incubados com extra-avidina por 45 min na mesma diluição do anticorpo secundário (1:200). As secções foram lavadas 6 vezes durante 5 min com solução de PBS + Triton X-100 a 0,1% e 1 apenas vez por 5 min com PBS. A revelação colorimétrica foi realizada com solução de PBS + DAB® 3,3'diaminobenzidina + peróxido de hidrogênio, sendo interrompida após 10 min com água destilada. Posteriormente, as secções foram desidratadas em série crescente de etanol (70% - 100%) e diafanizadas em dois banhos em xilol por 3 min cada banho. As lâminas foram montadas com meio Entellan®. Os controles negativos da reação por imuno-histoquímica foram realizados seguindo o mesmo protocolo, suprimindo-se apenas a incubação com o anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS.

Quadro 1: Relação dos anticorpos primários utilizados nas marcações celulares por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.

Anticorpos primários	Isotipo	Espécie em que foi desenvolvido	Objetivo da marcação
anti-p53 (policlonal, Santa Cruz)	IgG	Coelho	Identificar se a apoptose está sendo induzida em resposta ao dano no DNA
anti-Bcl 2 (monoclonal, Chemicon)	IgG1	Camundongo	Identificar se a apoptose está sendo induzida em resposta à alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais
anti-Bak (policlonal, Santa Cruz)	IgG	Coelho	
anti-Fas (policlonal, Santa Cruz)	IgG	Coelho	Identificar se a apoptose está sendo induzida pela ativação de receptor de morte na membrana plasmática
anti-Caspase 8 (monoclonal, Santa Cruz)	IgG1	Camundongo	Identificar a ativação de caspases durante a apoptose
anti-Caspase 3 ativa (policlonal, Abcam)	IgG	Coelho	

Quadro 2: Relação dos anticorpos secundários utilizados nas marcações celulares por imuno-histoquímica e citometria de fluxo.

Anticorpos secundários	Tipo de reação	Isotipo	Espécie em que foi desenvolvido
anti-coelho conjugado a peroxidase (Sigma)	Colorimétrica	IgG	Cabra
anti-camundongo conjugado a peroxidase (Santa Cruz)		IgG1	Cabra
anti-coelho Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes)	Fluorescente	IgG	Cabra
anti-camundongo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)		IgG1	Cabra

3.8 Marcações celulares por citometria de fluxo

Desovas inteiras, com aproximadamente 2500 ovos, foram fixadas com paraformaldeído a 1% por 24 h a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por 3 vezes, durante 5 min, em tampão PBS [(composto por 500 mM de cloreto de sódio (NaCl) + 3 mM de cloreto de potássio (KCl) + 1 mM de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e 12 mM de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄)/L)] pH 7,8. Os ovos foram triturados utilizando homogeneizador de tecidos BioSpec®, com 1 mL de solução PBS + Tween20® e, em seguida adicionado 0,25% de tripsina (Quimis®) por 15 min à temperatura ambiente para dissociação das células. Após, foi adicionado nas amostras 200 µL de SFB a 10% por 45 min para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 640 x g por 10 min. Após, foi retirada a fração intermediária com as células em suspensão, as quais foram centrifugadas novamente a 640 x g, durante 10 min. A fração intermediária foi utilizada e as amostras contendo as células embrionárias foram separadas em alíquotas de 350 µL. As alíquotas foram incubadas com os mesmos anticorpos primários descritos no Quadro 1, na diluição de 1:1000, durante 60 min a 4°C e em agitação. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anticorpos

secundários fluorescentes (Quadro 2) na diluição de 1:1000 por 45 min a 4°C, em agitação, ao abrigo de luz. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCanto II) no Laboratório Multiusuário I (LAMEB I) do CCB/ UFSC.

3.9 Análise dos dados

A marcação das células submetidas à técnica de TUNEL e aquelas marcadas por imuno-histoquímica colorimétrica foram fotografadas em microscópio NIKON Eclipse 80i, nas objetivas de 10x, 60x e 100x. As análises por citometria de fluxo foram realizadas no programa Flowing Software versão 2.5. A partir da leitura de 10.000 eventos celulares em citômetro de fluxo, foi realizada a delimitação da população de células analisadas (população-alvo) com base nos parâmetros de tamanho (FSC, do inglês *Forward Scatter*) por complexidade (SCC, do inglês *Side Scatter*). A partir da população-alvo, obtiveram-se os histogramas de intensidade de fluorescência. Essa regionalização foi obtida através da identificação da integridade celular por meio da utilização de iodeto de propídeo. Para a análise das marcações foi estabelecido como referência 3.500 eventos. Os resultados foram gerados na forma de porcentagem de células positivas.

3.10 Análise estatística

Os resultados da quantificação das proteínas por citometria de fluxo foram avaliados no programa estatístico Statistica® versão 6.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da radiação UVB sobre a indução a apoptose

De acordo com a marcação pelo método de TUNEL, foram consideradas características de apoptose a marcação específica, que indica fragmentação no DNA e início de processo apoptótico. As imagens obtidas mostram, ao longo dos tempos analisados, a presença de células apoptóticas nos embriões de *M. olfersi* expostos à radiação UVB (Figura 5), porém não se pode afirmar que há um aumento da quantidade de células marcadas. Além disso, as marcações foram observadas em todas as regiões embrionárias, não sendo reconhecidas regiões específicas de marcação nos embriões.

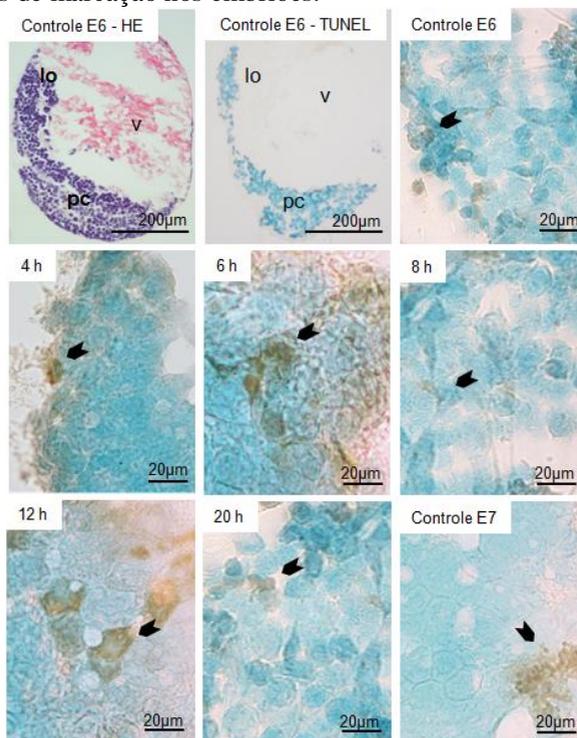


Figura 5: Marcações de células apoptóticas em embriões de *M. olfersi* pelo método de TUNEL. Secção sagital de embrião de *M. olfersi* do grupo controle E6 em coloração HE. Secção sagital de embrião de *M. olfersi* do grupo controle E6 submetido ao método de TUNEL. Detalhe de marcação nos grupos irradiados após 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 20 h. Setas indicam células em apoptose. lo, lobo óptico; pc, papila caudal; v, vitelo.

4.2 Efeito da radiação UVB sobre a expressão das proteínas envolvidas no processo apoptótico

A proteína p53, quando analisada por imuno-histoquímica, foi identificada em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidas em sítios específicos para esta marcação. Contudo, foi observada a presença dessa proteína tanto no citoplasma quanto no núcleo dos embriões de *M. olfersi* ao longo dos tempos analisados (Figura 6).

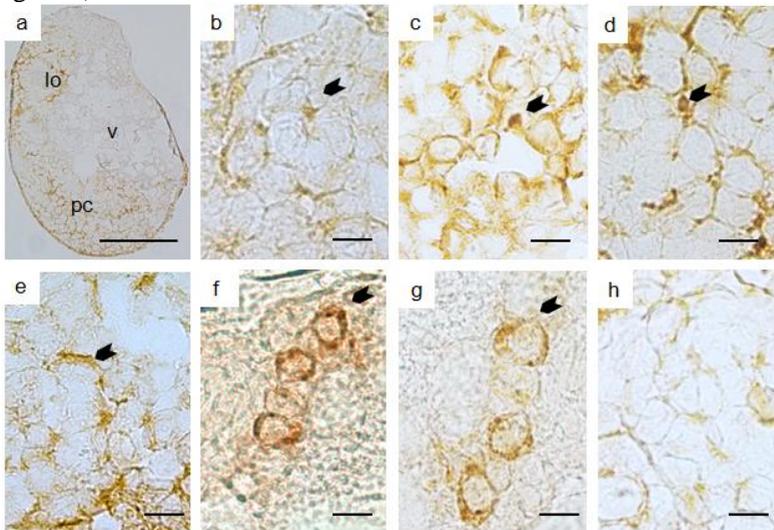


Figura 6: Imunomarcaçao para identificacao da proteina p53 em embrioes de *M. olfersi*. (a) Secçao sagital de embriao do grupo controle E6. (b) Detalhe de marcaçao do grupo controle E6. (c) Detalhe de marcaçao dos grupos irradiados 4 h (c), 6 h (d), 8 h (e), 12 h (f) e 20 h (g). Detalhe de marcaçao do grupo controle E7 (h). Seta indica célula imunorreativa. v, vitelo; lo, lobo óptico; pc, papila caudal;. Barras de escala (a) = 200 µm; (b, c, d, e, f, g, h) = 20 µm.

A análise da proteína p53, por citometria de fluxo, analisada nas primeiras 12 h após a exposiçao à radiaçao UVB (Figura 7), revelou aumento significativo da expressao em 6 h ($1,17\% \pm 0,24$; $p < 0,05$), quando comparados com os embrioes controle E6 ($0,47\% \pm 0,01$). No tempo de 4 h ($0,81\% \pm 0,13$) houve um aumento dessa proteina, mas houve um decréscimo após 8 h ($1,01\% \pm 0,19$) e 12 h ($0,70\% \pm 0,05$). A análise de p53 após as 12 h mostrou que houve um aumento significativo da expressao dessa proteina nos embrioes após 20 h da exposiçao ($1,41\% \pm 0,25$; $0,0001$), quando comparado com os embrioes controle E7 ($0,29\% \pm 0,03$; $p < 0,0001$).

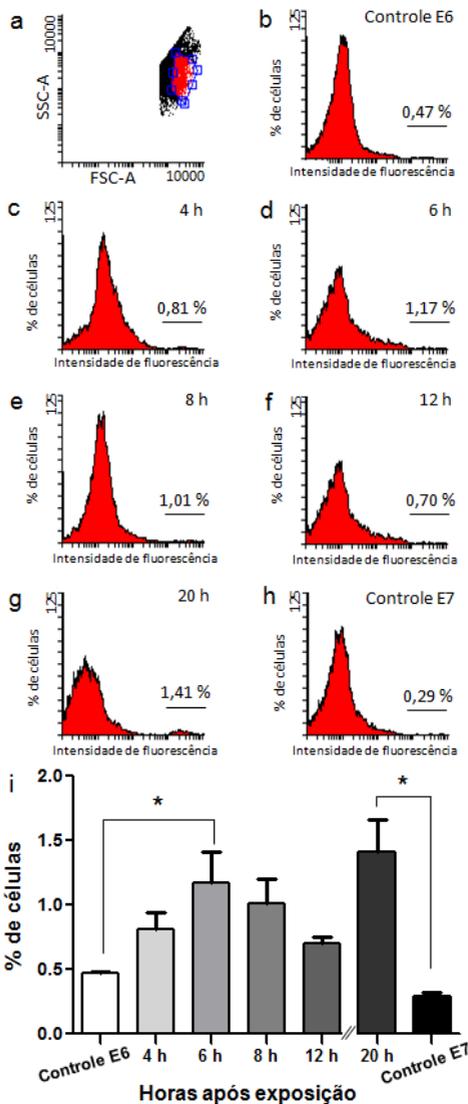


Figura 7: Análise por citometria de fluxo da proteína p53 em embriões de *M. olearius*. a) Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células analisadas (vermelho). (b-h) Histogramas representando a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-p53 da população em vermelho. i) Gráfico das porcentagens de células marcadas nos diferentes grupos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$). Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes. // representa mudança na escala de tempo.

A proteína Bak, envolvida na manutenção da permeabilidade mitocondrial, quando analisada por imuno-histoquímica, foi identificada em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidas em sítios específicos para esta marcação (Figura 8).

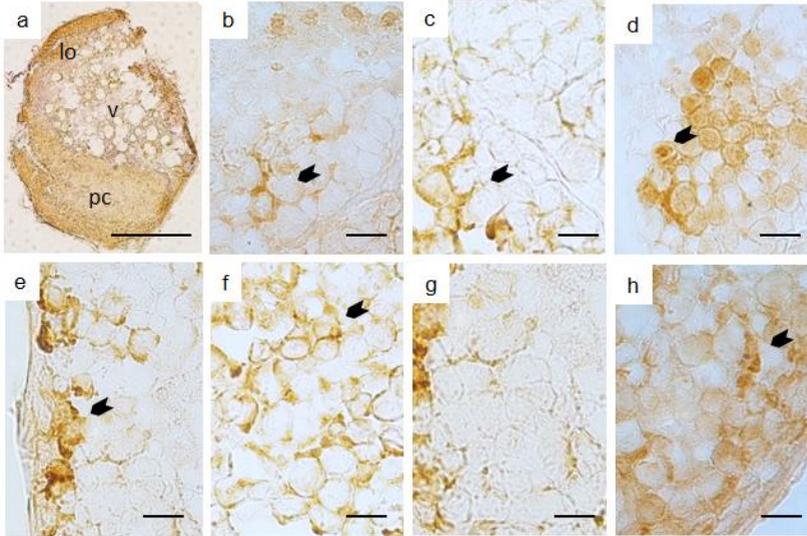


Figura 8: Imunomarcção para identificação da proteína Bak em embriões de *M. olfersi*. (a) Secção sagital de embrião do grupo controle E6. (b) Detalhe de marcação do grupo controle E6. Detalhe de marcação dos grupos irradiados 4 h (c), 6 h (d), 8 h (e), 12 h (f) e 20 h (g). Detalhe de marcação do grupo controle E7 (h). Seta indica célula imunorreativa. v, vitelo; lo, lobo óptico; pc, papila caudal. Barras de escala (a) = 200 μ m; (b, c, d, e, f, g, h) = 20 μ m.

A análise da marcação celular da proteína Bak, por citometria de fluxo, mostrou um aumento significativo nos embriões de 6 h ($3,44 \% \pm 0,68$; $p < 0,05$) após a exposição à radiação UVB em comparação com os demais grupos irradiados de 4 h ($0,85 \% \pm 0,11$), 8 h ($1,01 \% \pm 0,20$), 12 h ($0,9 \% \pm 0,12$) e controle E6 ($0,63 \% \pm 0,12$) (Figura 9). Após 20 h de exposição a radiação observou-se um aumento de células marcadas com anti-Bak ($0,91 \% \pm 0,14$), quando comparado ao controle E7 ($0,63 \% \pm 0,05$; $p > 0,05$).

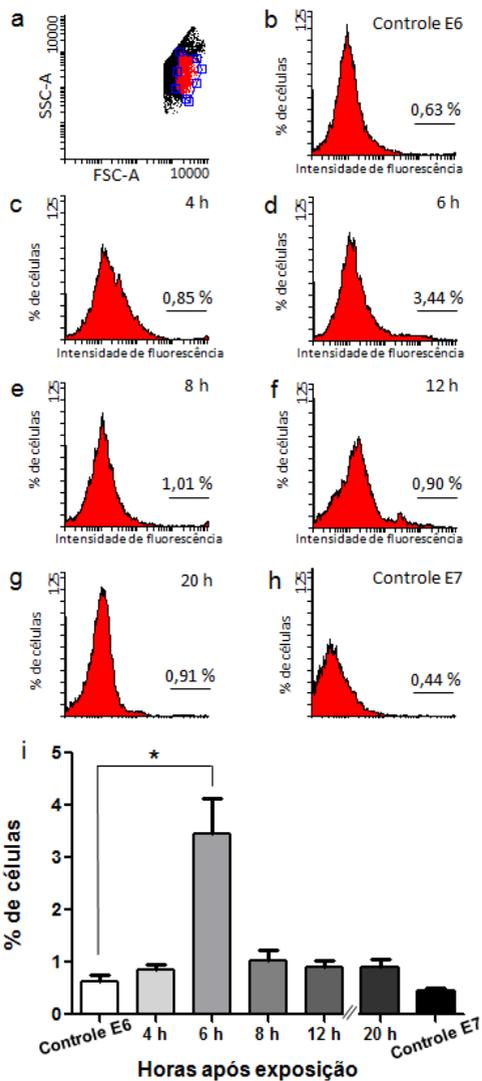


Figura 9: Análise por citometria de fluxo da proteína Bak em embriões de *M. olfersi*. a) Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células analisadas (vermelho). (b-h) Histogramas representando a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-Bak da população em vermelho. i) Gráfico das porcentagens de células marcadas nos diferentes grupos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$). Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes. // representa mudança na escala de tempo.

A proteína Bcl 2, também relacionada à manutenção da permeabilidade mitocondrial, quando analisada por imuno-histoquímica foi identificada em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidos em sítios específicos para esta marcação (Figura 10).

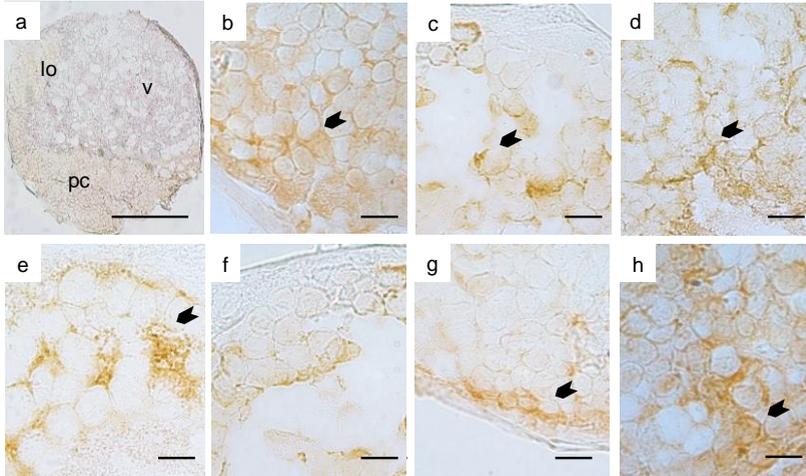


Figura 10: Imunomarcaco para identificaco da proteína Bcl 2 em embriões de *M. oifersi*. (a) Secção sagital de embrião do grupo controle E6. (b) Detalhe de marcação do grupo controle E6. (c) Detalhe de marcação dos grupos irradiados 4 h (c), 6 h (d), 8 h (e), 12 h (f) e 20 h (g). Detalhe de marcação do grupo controle E7 (h). Seta indica celula imunorreativa. v, vitelo; lo, lobo óptico; pc, papila caudal. Barras de escala (a) = 200 m; (b, c, d, e, f, g, h) = 20 m.

A quantificaco da marcação da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl 2, embora tenha apresentado variação na expressão, não diferiu significativamente entre os controles e os demais grupos irradiados com UVB (Figura 11). No entanto, vale ressaltar a existência de um pico de expressão de Bcl 2 após 6 h ($0,06\% \pm 0,02$), quando comparado com o controle E6 ($0,01\% \pm 0,006$). Nos demais grupos, a expressão dessa proteína foi menor em 4 h ($0,02\% \pm 0,004$), 8 h ($0,03\% \pm 0,01$) e 12 h ($0,01\% \pm 0,001$). Os embriões do controle E7 ($0,06\% \pm 0,02$) apresentaram aumento de Bcl 2 em relao aos embriões de 20 h após a exposio ($0,01\% \pm 0,001$; $p > 0,05$).

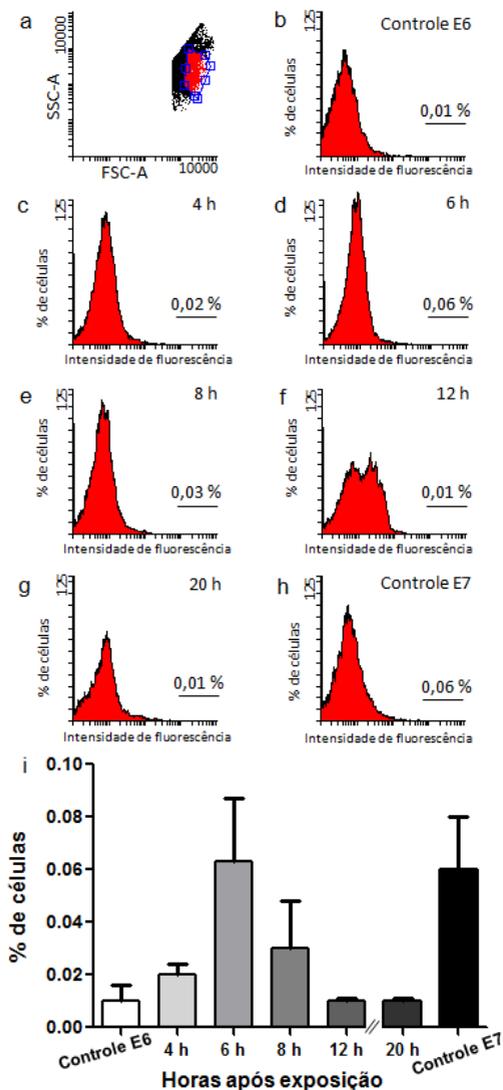


Figura 11: Análise por citometria de fluxo da proteína Bcl 2 em embriões de *M. olearius*. a) Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células analisadas (vermelho). (b-h) Histogramas representando a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-Bcl 2 da população em vermelho. i) Gráfico das porcentagens de células marcadas nos diferentes grupos. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes. // representa mudança na escala de tempo.

A proteína Fas, que atua como receptor de morte na membrana plasmática, quando analisada por imuno-histoquímica foi identificada em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidas em sítios específicos para esta marcação (Figura 12).

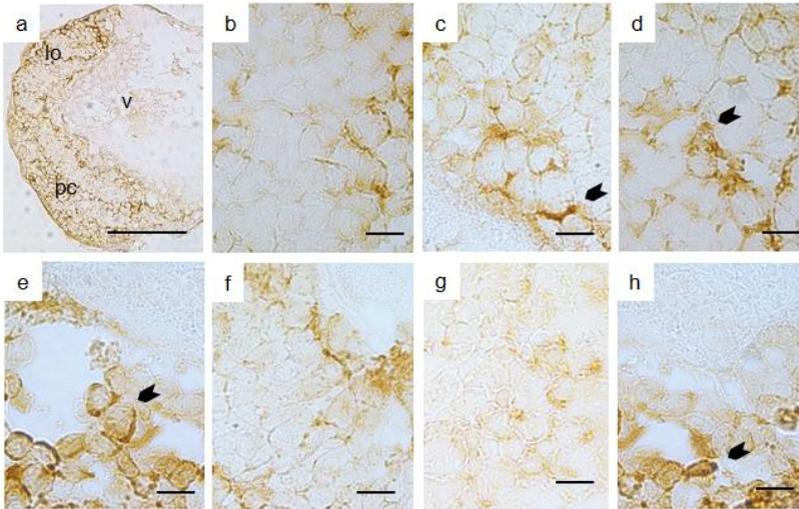


Figura 12: Imunomarcção para identificação da proteína Fas em embriões de *M. olearius*. (a) Secção sagital de embrião do grupo controle E6. (b) Detalhe de marcação do grupo controle E6. Detalhe de marcação dos grupos irradiados 4 h (c), 6 h (d), 8 h (e), 12 h (f) e 20 h (g). Detalhe de marcação do grupo controle E7 (h). Seta indica célula imunorreativa. v, vitelo; lo, lobo óptico; pc, papila caudal. Barras de escala (a) = 200 μ m; (b, c, d, e, f, g, h) = 20 μ m.

A análise da proteína Fas, mostrou um aumento significativo nos embriões de 8 h ($2,34\% \pm 0,62$; $p < 0,05$) quando comparados com os controles E6 ($0,85\% \pm 0,04$), 4 h ($0,37\% \pm 0,06$) e 6 h ($0,47\% \pm 0,03$). Os embriões de 12 h ($3,66\% \pm 0,46$; $p < 0,05$) também aumentaram significativamente em comparação ao controle E6, 4 h e 6 h, além de 8 h (Figura 13). Os embriões de 20 h ($1,29\% \pm 0,38$) após a exposição se mostraram aumentados para a proteína Fas, quando comparado ao controle E7 ($0,12\% \pm 0,05$; $p > 0,05$).

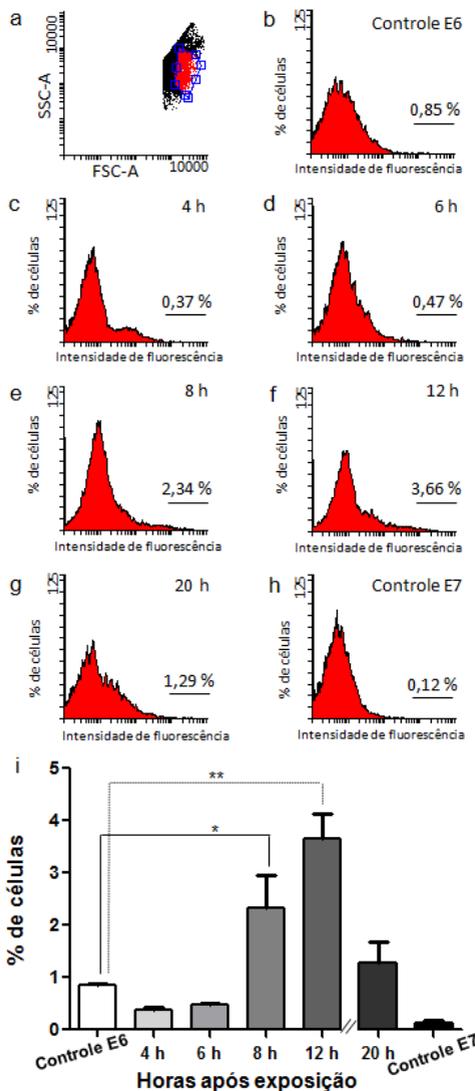


Figura 13: Análise por citometria de fluxo da proteína Fas em embriões de *M. olearii*. a) Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células analisadas (vermelho). (b-h) Histogramas representando a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-Fas da população em vermelho. i) Gráfico das porcentagens de células marcadas nos diferentes grupos. * e ** indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes. // representa mudança na escala de tempo.

A proteína Caspase 8, envolvida na morte celular programada induzida por Fas na via extrínseca, quando analisada por imunohistoquímica foi identificado um baixo número de marcações. Porém ocorreu em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidas em sítios específicos para esta marcação (Figura 14).

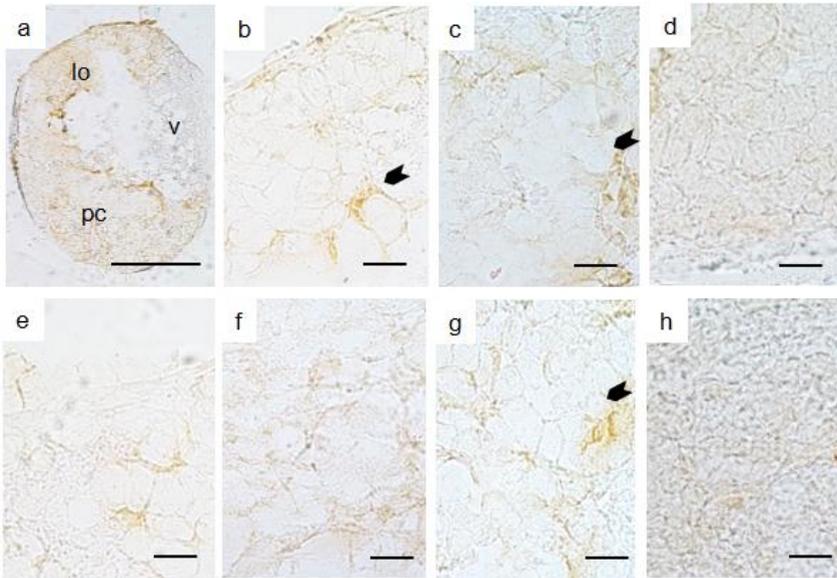


Figura 14: Imunomarcção para identificação da proteína Caspase 8 em embriões de *M. olfersi*. (a) Secção sagital de embrião do grupo controle E6. (b) Detalhe de marcação do grupo controle E6. Detalhe de marcação dos grupos irradiados 4 h (c), 6 h (d), 8 h (e), 12 h (f) e 20 h (g). Detalhe de marcação do grupo controle E7 (h). Seta indica célula imunorreativa. v, vitelo; lo, lobo óptico; pc, papila caudal. Barras de escala (a) = 200 μ m; (b, c, d, e, f, g, h) = 20 μ m.

O resultado para Caspase 8 mostrou um aumento significativo na expressão dessa proteína em 20 h ($0,06\% \pm 0,02$; $p < 0,05$) após a irradiação, quando comparado com o controle E7 ($0,005\% \pm 0,005$; $p < 0,05$) (Figura 15). A expressão desta proteína não diferiu significativamente entre o controle E6 ($0,02\% \pm 0,01$) e os demais grupos irradiados com UVB; 4 h ($0,02\% \pm 0,008$), 6 h ($0,03\% \pm 0,01$), 8 h ($0,04\% \pm 0,01$) e 12 h ($0,02\% \pm 0,006$).

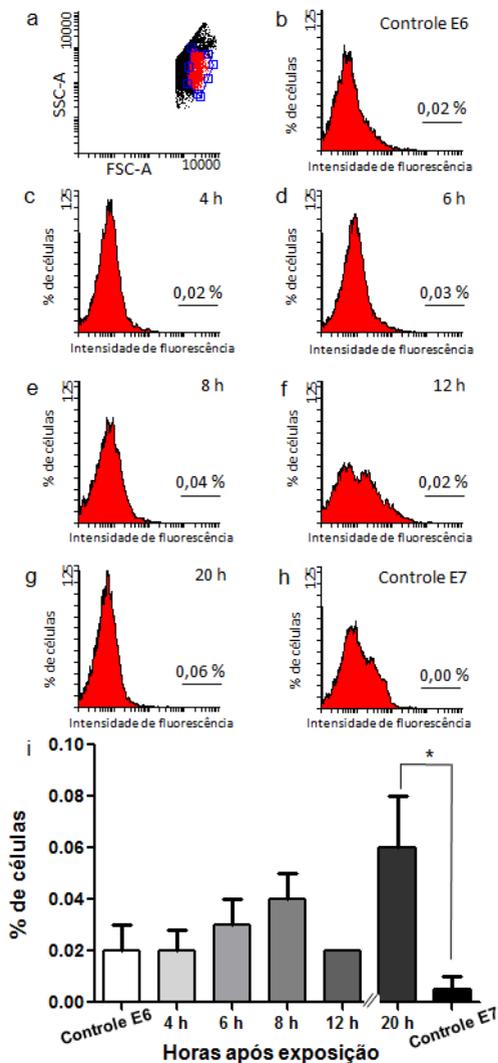


Figura 15: Análise por citometria de fluxo da proteína Caspase 8 em embriões de *M. olearii*. a) Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células analisadas (vermelho). (b-h) Histogramas representando a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-Caspase 8 da população em vermelho. i) Gráfico das porcentagens de células marcadas nos diferentes grupos. * indica diferença significativa ($p < 0,05$). Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes. // representa mudança na escala de tempo.

A proteína Caspase 3, efetora do processo apoptótico, quando analisada por imuno-histoquímica foi identificada em todas as regiões do embrião, não podendo ser reconhecidos em sítios específicos para esta marcação (Figura 16).

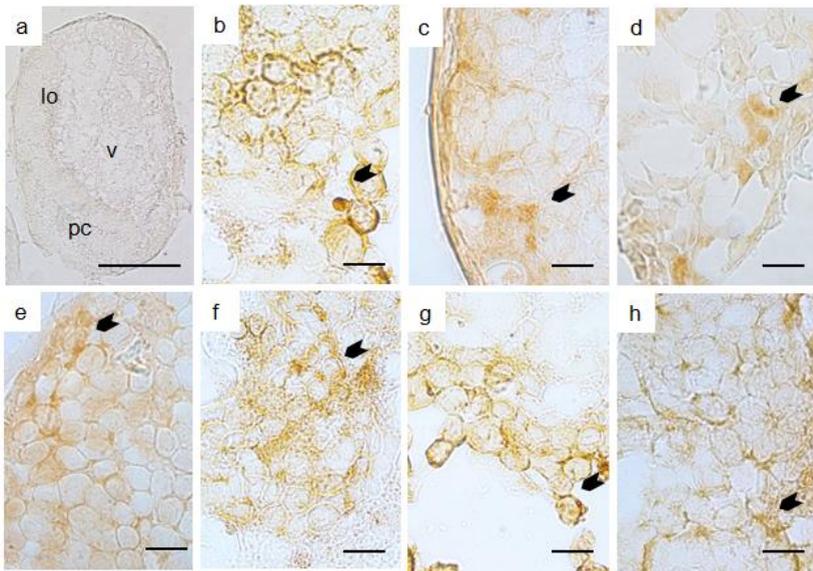


Figura 16: Imunomarcção para identificação da proteína Caspase 3 em embriões de *M. olearius*. (a) Secção sagital de embrião do grupo controle E6. (b) Detalhe de marcação do grupo controle E6. Detalhe de marcação dos grupos irradiados 4 h (c), 6 h (d), 8 h (e), 12 h (f) e 20 h (g). Detalhe de marcação do grupo controle E7 (h). Seta indica célula imunorreativa. lo, lobo óptico; pc, papila caudal; v, vitelo. Barras de escala (a) = 200 μ m; (b, c, d, e, f, g, h) = 20 μ m.

A quantidade de células marcadas para a proteína Caspase 3 oscilou durante a análise temporal após a irradiação com UVB (Figura 17). Observou-se uma redução significativa nos embriões após 8 h ($0,82\% \pm 0,12$; $p < 0,05$), comparado com o controle E6 ($2,21\% \pm 0,48$) e com os embriões após 6 h ($2,19\% \pm 0,37$) e 12 h ($2,61\% \pm 0,54$). Além disso, não foi observada diferença significativa entre 20 h ($1,04\% \pm 0,17$) e controle E7 ($0,61\% \pm 0,01$).

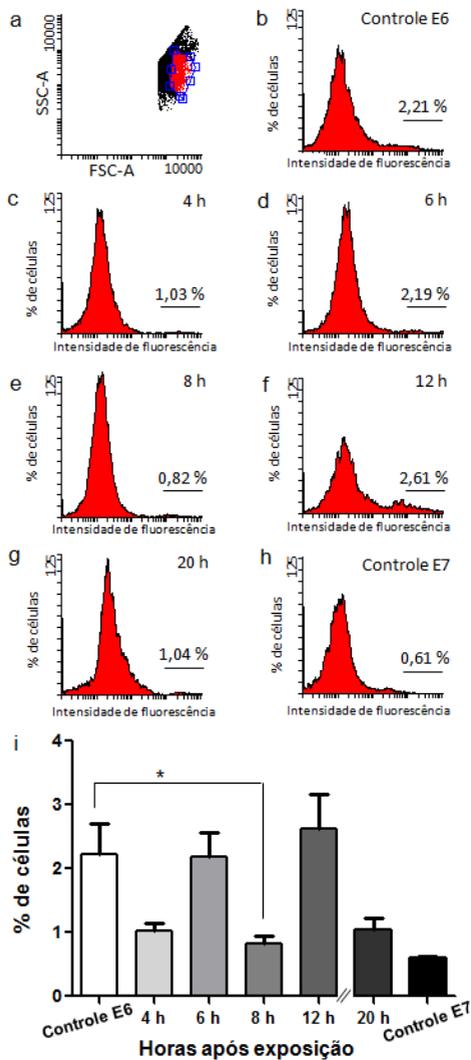


Figura 17: Análise por citometria de fluxo da proteína Caspase 3 em embriões de *M. oleari*. a) Dot plot demonstrando a população de células totais (preto) e a população de células analisadas (vermelho). (b-h) Histogramas representando a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-Caspase 3 da população em vermelho. i) Gráfico das porcentagens de células marcadas nos diferentes grupos. * e ** indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes. // representa mudança na escala de tempo.

As figuras 18 e 19 apresentam duas formas de compilação dos dados obtidos na técnica de citometria de fluxo. A figura 18 destaca a dinâmica das proteínas investigadas ao longo dos tempos analisados após a exposição UVB, enquanto que a figura 19 destaca a expressão individual das proteínas após a irradiação.

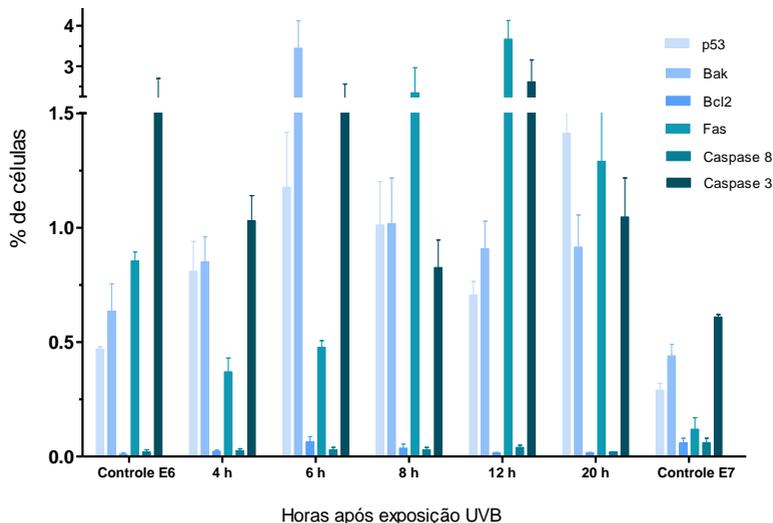


Figura 18: Análise por citometria de fluxo das proteínas envolvidas no processo de apoptose em embriões de *M. oleari* expostas à radiação UVB. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes.

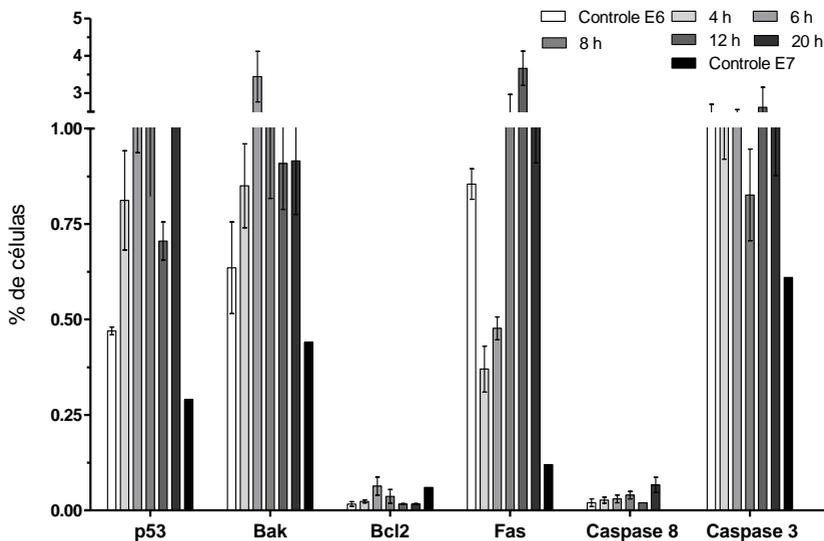


Figura 19: Análise por citometria de fluxo das marcação das proteínas envolvidas na apoptose em amostras de embriões de *M. olfersi*. Dados apresentados em média (\pm erro padrão). $n = 12.500$ ovos/grupo, num total de cinco experimentos independentes.

O Quadro 3 representa a expressão temporal de proteínas e sua respectiva localização celular, após exposição a radiação UVB. Observa-se primeiramente um aumento de p53 e Bak em todos os tempos analisados, sugerindo o envolvimento de proteínas da via intrínseca nuclear simultaneamente com proteínas da via intrínseca citoplasmática. Num segundo momento, após 8 h, observa-se aumento do receptor Fas, que participa da via extrínseca e por último, a participação de Caspase 3 após 12 h. Em conjunto, essas informações podem fornecer subsídios para a compreensão das prováveis vias apoptóticas ativadas após o insulto da radiação UVB.

Quadro 3: Resumo dos resultados obtidos para cada proteína em relação ao tempo de análise após a irradiação com UVB.

Proteínas investigadas e sua localização		Expressão comparada com o controle E6				Expressão comparada com o controle E7
		4 h	6 h	8 h	12 h	20 h
Nuclear/ Citoplasma	p53	↑	↑	↑	↑	↑
	Bak	↑	↑	↑	↑	↑
Mitocondrial	Bcl 2	↑	↑	↑		
	Fas			↑	↑	↑
Citoplasma	Caspase 8		↑	↑		↑
	Caspase 3				↑	↑

Setas vermelhas indicam aumento da expressão das proteínas. Os destaques em azul representam aumento significativo de expressão das proteínas em relação ao respectivo controle.

5. DISCUSSÃO

As mudanças climáticas globais atuais, em particular aquelas relacionadas ao aumento da radiação UVB na superfície terrestre, constituem um problema ambiental que merece atenção. No entanto, os efeitos da exposição de organismos aquáticos à radiação UVB são pouco elucidados. O ambiente aquático e os organismos que nele vivem são importantes para manutenção da biodiversidade. A realização de estudos voltados para esta problemática deve ser incentivada.

Nesse sentido, no presente trabalho, os embriões do camarão de água doce *M. olfersi* foram utilizados como modelo de estudo buscando ampliar o conhecimento acerca das respostas biológicas diante da exposição à radiação UVB. A busca por essas respostas foi conduzida, mais especificamente, através da investigação espacial e temporal da expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico durante a morfogênese e organogênese iniciais.

No filo Arthropoda, onde estão incluídos os crustáceos, o conhecimento a respeito dos eventos relacionados à apoptose são mais esclarecidos em embriões da mosca-da-fruta *D. melanogaster*. Contudo, não é possível afirmar que o processo apoptótico ocorre da mesma forma nos crustáceos, pois os mecanismos que regulam a apoptose nesse grupo podem ser diferentes (Menze et al., 2010; Wu et al., 2014; Hollmann et al., 2015). Além disso, os artrópodes constituem um filo numeroso e diverso, cujas espécies habitam ecossistemas variados, sendo esperado que ocorram diferenças nas respostas celulares em função das adaptações ao ambiente em que vivem.

A apoptose é um mecanismo celular intrínseco e muito importante durante o desenvolvimento, pois é responsável pela manutenção do número de células embrionárias durante a morfogênese e organogênese (Doseff, 2004). Além disso, a apoptose pode se constituir como um mecanismo de defesa celular frente a estímulos extrínsecos (Zhou e Steller, 2003; Romero et al., 2011). É importante destacar, porém, que tais estímulos extrínsecos podem desencadear outros tipos de morte celular. Especificamente, a apoptose tem sido referida como o tipo de morte celular mais típico após a exposição à radiação UVB (Menze et al., 2010).

Em resposta a um dos objetivos deste trabalho, a ocorrência de apoptose foi identificada em embriões de *M. olfersi* expostos à radiação UVB. As marcações de células apoptóticas foram visualizadas, não só nos grupos irradiados como também nos controles E6 e E7. Esse fato pode estar relacionado com o mecanismo de apoptose inerente ao desenvolvimento embrionário, o qual é independente do insulto da

radiação. Do mesmo modo, em indivíduos adultos de caranguejos *Ucides cordatus* a apoptose foi uma resposta celular frente a exposição à radiação UVB, tendo sido identificada também nos tecidos de caranguejos não expostos. Assim, a apoptose também desempenha importante papel na manutenção de células em organismos adultos (Miguel et al., 2007).

Em relação à localização espacial das células apoptóticas nos embriões de *M. olfersi* verifica-se a ocorrência de apoptose em todas as regiões embrionárias, como nos lobos ópticos, apêndices e papila caudal, e não foi possível apontar regiões definidas com maior intensidade de células marcadas. Certamente essas regiões embrionárias são constituídas por células em proliferação, migração e adesão, de modo que a radiação UVB pode desencadear apoptose independentemente do momento em que a célula se encontra.

A apoptose, nas células de organismos expostos pela radiação UVB, pode ser ativada por diferentes vias (Kulms e Schwarz, 2002). Como já mencionado neste trabalho, uma das vias apoptóticas intrínsecas é aquela ativada por uma resposta celular ao dano no DNA. Um indicativo desse dano é o aumento na expressão da proteína p53, a qual sinaliza para possíveis mecanismos de reparo (Lesser et al., 2001; Cadet et al., 2005; Dahms e Lee, 2010; Belyi et al., 2010). No presente trabalho, o reconhecimento do aumento significativo de p53 após 6 h da irradiação é um forte indicativo da ocorrência de dano ao DNA embriões de *M. olfersi*. Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Mirzayans e colaboradores (2012), que observaram um pico de expressão de p53, em células humanas, também 6 h após a exposição à radiação gama (γ). Em estudos anteriores realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal foram reconhecidos, em embriões de *M. olfersi*, danos diretos ao DNA, através da formação de dímeros de pirimidina 1 h após a radiação UVB (Zeni, 2013). Considerando esse fato, e que o aumento de p53 foi evidenciado neste trabalho a partir de 6 h após o insulto, podemos sugerir que há um recrutamento rápido da maquinaria celular e, também rapidamente, o reconhecimento desse dano e sinalização para o reparo. Assim, o reconhecimento do pico de p53 6 h após o insulto é um forte indicativo de que a sinalização para o reparo não foi bem sucedido. Mirzayans e colaboradores (2012) sugerem que a expressão de p53 pode ser explicada porque num primeiro momento, após a detecção do dano ao DNA, ocorre a checagem do ciclo celular e, em um segundo momento, a síntese de proteínas responsáveis pelo reparo desse dano.

Complementando, nossos resultados referentes à imunolocalização de p53, reconhecida tanto no núcleo, quanto no citoplasma das células embrionárias de *M. olfersi*, indicam sua função de sinalização de dano nuclear e ativação de proteínas pró-apoptóticas citoplasmáticas. Resumidamente, em situações onde os mecanismos de reparo não são bem sucedidos, a p53 sinaliza para a ativação de proteínas pró-apoptóticas e a inibição de proteínas anti-apoptóticas (Chi et al., 2014). Em ostras *Crassostrea hongkongensi*, tanto Bax quanto Bak, proteínas pró-apoptóticas, mostraram ser reguladores chave da apoptose nos estágios iniciais de desenvolvimento (Xiang et al., 2015). Os resultados obtidos em embriões de *M. olfersi* para a proteína pró-apoptótica Bak revela uma superexpressão em 6 h após a exposição UVB. Esse fato permite sugerir que a radiação UVB induziu danos ao DNA, conforme o aumento verificado da expressão da proteína p53, e que não foram reparados, interferindo no potencial de membrana mitocondrial, desencadeado pelo aumento da proteína pró-apoptótica Bak. Assim, a radiação UVB provocou alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial, principalmente após 6 h da exposição.

Quando há superexpressão de proteínas pró-apoptóticas, é esperado que as anti-apoptóticas, responsáveis pela manutenção do potencial de membrana mitocondrial não sejam tão eficientes na sua função (Opferman e Korsmeyer, 2003; Franco et al., 2009; Teijido e Dejean, 2010). No presente trabalho, a proteína anti-apoptótica Bcl 2, nas primeiras 8 h após a irradiação não foi responsiva pelo aumento da pró-apoptótica Bak. Estudos realizados por Nazari (2010) demonstraram que células embrionárias de *M. olfersi* apresentaram fraca expressão de Bcl 2, porém isso foi detectado somente após 96 h da exposição à radiação UVB. Diante das análises de Bak e Bcl 2 podemos sugerir que houve alteração do potencial de membrana mitocondrial e, é sabido que essa alteração pode estar envolvida com a liberação de citocromo *c*. A liberação de citocromo *c*, no citoplasma, leva à ativação de outras proteínas envolvidas no desencadeamento da apoptose (Czabotar et al., 2014).

Menze e colaboradores (2010) mencionam que a diversidade de Bcl 2 em crustáceos parece ser maior que em drosófila. No entanto, a regulação de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl 2 ainda não está elucidada em crustáceos. Embora ainda haja essa lacuna do conhecimento em crustáceos, os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem sugerir que, após a exposição à radiação UVB, foi possível reconhecer a participação de proteínas envolvidas nas duas vias intrínsecas de ativação à apoptose.

Além das proteínas da via apoptótica intrínseca, mencionadas acima, neste trabalho também foi investigado se a via extrínseca é ativada em embriões de *M. olfersi* expostos à radiação UVB. Essa via é desencadeada por sinal extracelular através de receptores de morte na membrana plasmática, como o receptor Fas (Kulms e Schwarz, 2002; Hail et al., 2006). Em 1987, Köteles e colaboradores, já notaram alterações na membrana das células como consequência da exposição UV em fibroblastos humanos que, para a época, representou um expressivo avanço nessa área. Analisando os valores obtidos para a proteína Fas neste trabalho, verificou-se que esse receptor não foi ativado nos embriões de *M. olfersi* nas primeiras horas após a exposição UVB, sendo reconhecido superexpressão principalmente após 12 h da exposição. Em cultura de células o receptor Fas se mostrou aumentado após 12 h da irradiação (Abdulkarim et al., 2000), coincidindo com o encontrado neste estudo. Pesquisa com cultura de fibroblastos embrionários de camundongo expostos à radiação UVC mostrou que a apoptose foi ativada pelo receptor de morte, simultaneamente à diminuição da expressão de Bcl 2 e o aumento de p53 (Tomicic et al., 2005). Esses autores sugerem que, dependendo da quantidade de p53, a mesma célula pode responder, ora por ativação da via mitocondrial, ora por ativação da via dependente de Fas.

Na continuação da sinalização de apoptose pela via extrínseca é necessário a ativação da Caspase 8 (Chowdhury et al., 2008). Diferentemente de Fas, os valores dessa proteína aumentaram significativamente 20 h após o insulto da radiação. No entanto, por ser uma proteína responsiva ao sinal do receptor transmembrana, é esperado que Caspase 8 e Fas não sejam ativadas simultaneamente. Deve-se levar em conta a dinâmica do processo apoptótico e compreender a necessidade de ativação de outras proteínas intermediárias envolvidas na transdução citoplasmática dos sinais apoptóticos. Em contrapartida, pesquisa com culturas de células de camundongo expostas a radiação UVA, UVB e UVC sugere que a ativação de membrana é muito mais rápida que aquela ativada por dano ao DNA (Godar, 1996).

Ambas as vias, intrínseca e extrínseca, terminam com a clivagem da Caspase 3. Essa proteína desempenha um papel fundamental na execução do processo de apoptose, pois é a última, da cascata de caspases a ser ativada (Cohen, 1997; Chowdhury et al., 2008). No presente verificou-se que a radiação UVB, na dose utilizada e nos tempos analisados não interferiu na expressão de Casapse 3. Contudo, estudo realizado em tecidos do caranguejo *Eriocheir sinensis* confirmou a presença de Caspase 3, bem como a sua função efetora no processo

apoptótico em crustáceos (Wu et al., 2014). Sendo assim, os resultados aqui obtidos podem estar relacionados com o tempo que a célula necessita para desencadear a apoptose. Alguns estudos demonstraram a expressão tardia de Caspase 3 após o insulto provocado por estresse químico em cardiomiócitos de camundongos adultos (Suzuki et al., 2001) e também em células da gástrula de ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Thurber e Epel; 2007). Segundo Suzuki e colaboradores (2001), os autores mencionam ainda que a alteração de potencial de membrana mitocondrial ocorreu 2 h antes da ativação de Caspase 3. No entanto, Wang e colaboradores (2013) verificaram que a expressão gênica de Caspase 3 em brânquias de camarão *Litopenaeus vannamei* ocorreu somente após 24 h do insulto provocado por infecção viral, sendo o mesmo encontrado em cultura de células de linfócitos, também na indução de apoptose por infecção viral (Cooray et al., 2003). Estes dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho e revelam a reação em cascata do processo apoptótico e indicando ainda que a ocorrência de apoptose é temporalmente regulada.

Embora seja possível reconhecer diferenças no tempo de recrutamento das proteínas acima citadas, estas diferenças são sutis e possivelmente refletem o caráter conservativo de expressão dessas proteínas. Contudo, as diferenças encontradas entre os resultados aqui obtidos e os trabalhos disponíveis na literatura com relação ao tempo de ativação das vias envolvidas, podem ser explicadas pela diversidade, (i) quanto ao tipo celular estudado, (ii) ao grupo animal o qual pertence (mamífero *versus* crustáceo), (iii) a maturidade da célula (embrião *versus* adulto) e (iv) quanto ao tipo de insulto e o tempo de exposição.

Uma observação interessante é que os embriões de *M. olfersi* não expostos à radiação UVB apresentaram elevada expressão de Caspase 3, a qual pode estar relacionada com o mecanismo de apoptose inerente ao desenvolvimento embrionário e independente do insulto da radiação.

O presente estudo permitiu compreender que o tempo de análise após a irradiação foi suficiente para se observar a ativação das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca. Os resultados obtidos nos permitem avaliar que a radiação UVB provocou dano ao DNA e alteração de potencial de membrana mitocondrial, ambos relacionados à via intrínseca e que desencadeou apoptose em embriões de *M. olfersi*.

Em resumo, neste trabalho identificou-se a presença de duas vias ativadas em resposta à indução de apoptose pela exposição UVB em embriões de *M. olfersi*. Considerando que as proteínas envolvidas na via intrínseca estiveram aumentadas nas primeiras horas após a exposição das células embrionárias, sugere-se que a indução de apoptose não está

ocorrendo logo no início, pois possivelmente a maquinaria celular de reparo é recrutada num primeiro momento e somente mais tarde, se não houver reparo, irá ser reconhecida a clivagem da Caspase 3. Outro aspecto que merece destaque é a baixa expressão de Fas obtida nas horas iniciais após a irradiação, indicando ativação tardia da via extrínseca em embriões expostos à radiação UVB. Esses motivos levam a crer que a hipótese proposta nesse trabalho foi aceita, pois a radiação UVB interferiu no processo de apoptose recrutando proteínas envolvidas nas duas vias apoptóticas. Inicialmente acionando a via intrínseca por dano ao DNA não reparado e, mais tarde ativando a via extrínseca com início da apoptose na segunda metade do dia embrionário E6 após a exposição.

Diante da análise das proteínas envolvidas nas vias apoptóticas é importante observar que investigações mais aprofundadas, inclusive de expressão gênica, são recomendadas para elucidar os mecanismos adjacentes envolvidos na apoptose. Além disso, faz-se necessário o estudo da expressão de outras proteínas não investigadas neste trabalho, por exemplo: Hsp 70, proteína envolvida na presença de estresse celular; Apaf-1, envolvida na formação do apoptossomo; Citocromo *c*, relacionada à permeabilidade do potencial de membrana mitocondrial e, Caspase 9, também ligada à cascata de caspases da via intrínseca.

Os tempos de amostragem após a irradiação se mostraram bastante adequados até o intervalo de 12 h. Porém, a partir dos resultados obtidos, verifica-se a necessidade de se aumentar o número de amostragens no intervalo de 12 e 20 h, pois os dados provenientes dessas amostragens poderão ajudar a elucidar melhor o comportamento das proteínas envolvidas na indução à apoptose após o insulto da radiação UVB (Figura 20).

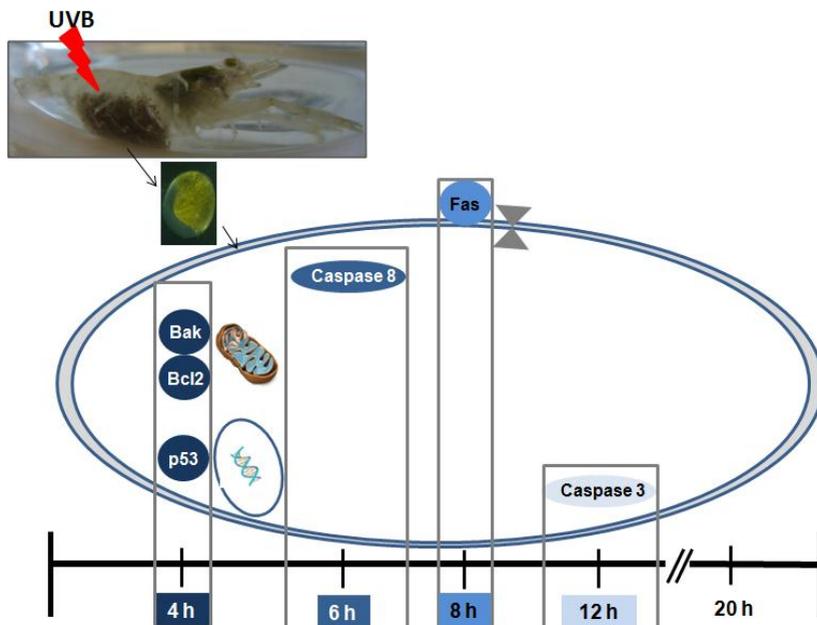


Figura 20: Resumo gráfico do efeito da radiação UVB sobre proteínas envolvidas na apoptose em embriões de *M. olfersi*.

Por fim, muito se tem estudado acerca dos efeitos da radiação UVB, principalmente com tecidos humanos e de outras espécies de vertebrados. Contudo, faz-se necessário ampliar ainda mais o foco dos estudos, investigando os efeitos da radiação em diferentes grupos animais, principalmente invertebrados, pela sua importância para a dinâmica dos ambientes onde vivem. Experimentos complementares para a marcação de outras proteínas envolvidas no processo de apoptose, certamente nos ajudarão a aprofundar o conhecimento dos efeitos da radiação UVB em embriões de *M. olfersi*.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos relacionados a temporalidade das proteínas envolvidas na indução à apoptose, após o insulto da radiação UVB mostram que esse tipo de morte em embriões de *M. olfersi* é muito dinâmica e necessária para a manutenção dos tecidos. A apoptose induzida por um insulto não reparado é tão necessária quanto a apoptose inerente, pois elimina células danificadas e mantém a integridade dos tecidos. Neste estudo, podemos ainda concluir que:

- a radiação UVB induziu apoptose nas células de todas as regiões embrionárias;
- as proteínas não são expressas simultaneamente;
- inicialmente, nas primeiras 4 horas após a irradiação com UVB, ocorre ativação da proteína p53, por dano ao DNA, e a ativação da expressão de Bak e Bcl 2, proteínas de manutenção da permeabilidade de membrana mitocondrial, todas envolvidas nas vias apoptóticas intrínsecas;
- 12 h após da irradiação com UVB, ocorre ativação do receptor de membrana Fas, envolvido na via apoptótica extrínseca;
- a apoptose é um mecanismo temporalmente regulado em embriões de *M. olfersi*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKARIM, B.; SABRI, S.; DEUSTCH, E.; VAGANAY, S.; MARANGONI, E.; VAINCHENKER, W.; BOURHIS, J. 2000. Radiation-induced expression of functional Fas ligand in EBV-positive human nasopharyngeal carcinoma cells. *International Journal of Cancer* 86, 229-237.
- AMMAR, D.; MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M. 2001. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegamn) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18, 529-537.
- BARONIYA, S.S.; SINGH, S.; KATARIAB, S.; PANDEYB, G.P.; GURUPRASADB, K.N. 2014. Growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in soybean varieties after exclusion of the UV-B and UV-A/B components of solar radiation. *The Crop Journal* 2, 388-397.
- BATISTA, L.F.; KAINA, B.; MENEGHINI, R.; MENCK, C.F. 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research* 681, 197-208.
- BELIYI, V.A.; AK, P.; MARKERT, E.; WANG, H.; HU, W.; PUZIO-KUTER, A.; LEVINE, A.J. 2010. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a001198.
- CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* 571, 3-17.
- CAMPANALE, J.P.; TOMANEK, L.; ADAMS, N.L. 2011. Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 397, 106-120.
- CARRASCO-MALIO, A.; DÍAZ, M.; MELLA, M.; MONTOYA, M.J.; MIRANDA, A.; LANDAETA, M.F.; SÁNCHEZ, G.; HIDALGO, M.E. 2014. Are the intertidal fish highly resistant to UV-B radiation? A study based on oxidative stress in *Girella laevis* (Kyphosidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100, 93-98.
- CASICCIA, C.; KIRCHHOFFB, V.W.J.H.; TORRESA, A. 2003. Simultaneous measurements of ozone and ultraviolet radiation: spring 2000, Punta Arenas, Chile. *Atmospheric Environment* 37, 383-389.
- CHI, X.; KALE, J.; LEBER, B.; ANDREWS, D.W. 2014. Regulating cell death at, on, and in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843, 2100-2113.

- CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G.K. 2008. Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 151, 10-27.
- COHEN, G.M.A.P. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326, 1-16.
- 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. *Photochemistry and Photobiology* 85, 144-152.
- COORAY, S.; BEST, J.M.; JIN, L. 2003. Time-course induction of apoptosis by wild-type and attenuated strains of rubella virus. *Journal of General Virology* 84, 1275-1279.
- CZABOTAR, P.E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J.M. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 49-63.
- DAHMS, H.U.; LEE, J.S. 2010. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* 97, 3-14.
- DÍAZ, S.; CAMILIÓN, C.; DEFERRARI, G.; FUENZALIDA, H.; ARMSTRONG, R.; BOOTH, C.; PALADINI, A.; CABRERA, S.; CASICCIA, C.; LOVENGREEN, C.; PEDRONI, J.; ROSALES, A.; ZAGARESE, H.; VERNET, M. 2006. Ozone and UV radiation over Southern South America: climatology and anomalies. *Photochemistry and Photobiology* 82, 834-843.
- DIFFEY, B.L. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology* 36, 299-328.
- DIFFEY, B.L. 2002. What is light? *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 18, 68-74.
- DONG, Q.; SVOBODA, K.; TIERSCH, T.R.; MONROE, W.T. 2007. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: evidence for a competent photorepair system. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 88, 137-146.
- D'ORAZIO, J.; JARRET, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. 2013. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 12222-12248.
- DOSEFF, A.I. 2004. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Development* 13, 473-483.
- DUNNE, R.P.; BROWN, B.E. 1996. Penetration of solar UVB radiation in shallow tropical waters and its potential biological effects on coral reefs; results from the central Indian Ocean and Andaman Sea. *Oceanographic Literature Review* 144, 109-118.

- DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. 2013 Beyond UV radiation: A skin under challenge. *International Journal of Cosmetic Science* 35, 224-232.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35, 495-516.
- EPEL, D. 2003. Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. *Evolution and development* 5, 83-88.
- FENG, R.; HAN, J.; ZIEGLER, J.; YANG, M.; CASTRANOVAET, V. 2012. Apaf-1 deficiency confers resistance to ultraviolet-induced apoptosis in mouse embryonic fibroblasts by disrupting reactive oxygen species amplification production and mitochondrial pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 889-897.
- FRANCO, R.; SANCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E.M.; PANAYIOTIDIS, M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutation Research* 674, 3-22.
- FUKUNISHI, 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*). *Marine Biology* 160, 2591-2596.
- GALLAGHER, R.P.; LEE, T.K. 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92, 119-131.
- GODAR, D.E. 1996. Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-Induced immediate and delayed apoptosis. *Photochemistry and Photobiology* 63, 825-830.
- GODAR, D.E.; POPE, S.J.; GRANT, W.B.; HOLICK, M.F. 2012. Solar UV doses of young americans and vitamin D3 production. *Environmental Health Perspectives* 120, 139-142.
- GONZALEZ, P.L.M.; POLVANI, L.M.; SEAGER, R.; CORREA, G.J.P. 2014. Stratospheric ozone depletion: a key driver of recent precipitation trends in South Eastern South America. *Climate Dynamics* 42, 1775-1792.
- 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). *Photochemistry and Photobiology* 81, 398-403.
- HACHIYA, A.; SRIWIRIYANONT, P.; FUJIMURA, T.; OHUCHI, A.; KITAHARA, T.; TAKEMA, Y.; KITZMILLER, W.J.; VISSCHER, M.O.; TSUBOI, R.; BOISSY, R.E. 2009. Mechanistic effects of long-

- term Ultraviolet B irradiation induce epidermal and dermal changes in human skin xenografts. *The American Journal Pathology* 174, 401-413.
- HÄDER, D.P.; HELBLING, E.W.; WILLIAMSON, C. E.; WORREST, R.C. 2011. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10, 242-260.
- HAIL, N.; CARTER, B.Z.; KONOPLEVA, M. 2006. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11, 889-904.
- 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 8th International Symposium on Microbial Ecology* 209-219p.
- HOCKBERGER, P.E. 2002. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* 76, 561-579.
- HOLLMANN, G.; FERREIRA, G.J.; GEIHS, M.A.; VARGAS, M.A.; NERY, L.E. M.; LEITÃO, A.; ALLODI, S. 2015. Antioxidant activity stimulated by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquatic Toxicology* 160, 151-162.
- HOVEL, K.A.; MORGAN, S.G. 1999. Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 237, 107-125.
- ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO,T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; HORIKAWA, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* 189, 21-39.
- JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- KARENTZ, D.; LUTZE, L.H. 1990. Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnology and Oceanography* 35, 549-561.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
- 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*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 167, 15-23.
- KIRCHHOFF, V.W.J.H.; SCHUCH, N.J.; PINHEIRO, D.K.; HARRIS, J.M. 1996. Evidence for an ozone hole perturbation at 30° south. Atmospheric Environment 30, 1481-1488.
- KIRCHHOFF, V.W.J.H.; ECHER, E. 2001. Erythema UV-B exposure near the Antarctic Peninsula and comparison with an equatorial site. Journal of Photochemistry and Photobiology B 60, 102-107.
- KÓTELES, G.J.; SOMOSY, Z.; KUBASOVA, T. 1987. Radiation-induced changes on cell surface charges. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation Part C 30, 389-399.
- KRUIDERING, M.; EVAN, G.I. 2000. Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? IUBMB life 50, 85-90.
- KULMS, D.; SCHWARZ, T. 2002. Independent contribution of three pathways ultraviolet-B-induced apoptosis. Biochemistry Pharmacology 64, 837-841.
- KUMAR, S.; JOSHI, P.C. 1992. Haemolysis by ultraviolet B of red blood cells from different animal species. Toxicology in vitro 6, 345-347.
- LANT, B.; DERRY, W.B. 2013. Methods for detection and analysis of apoptosis signaling in the *C. elegans* germline. Methods 61, 174-182.
- LESSER, M.P.; TURTLE, S.L.; FARRELL, J.H.; WALKER, C.W. 2001. Exposure to Ultraviolet radiation (290-400 nm) causes oxidative stress, DNA damage, and expression of p53/p73 in laboratory experiments on embryos of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. Physiological and Biochemical Zoology 74, 733-741.
- MAHMOUD, U.M.; MEKKAWY, I.A.; SAYED, A.E.D.H. 2009. Ultraviolet radiation-A (366nm) induced morphological and histological malformations during embryogenesis of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Journal of Photochemistry and Photobiology B 95, 117-128.
- MAIONE, M.; GIOSTRA, U.; ARDUINI, J.; FURLANI, F.; GRAZIOSI, F.; LO VULLO, E.; BONASONI, P. 2013. Ten years of continuous observations of stratospheric ozone depleting gases at Monte Cimone (Italy) - Comments on the effectiveness of the Montreal Protocol from a regional perspective. Science of the Total Environment 445, 155-164.
- MARROT, L.; MEUNIER, J.R. 2008. Skin DNA photodamage and its biological consequences. Journal of the American Academy of Dermatology 58, 139-148.

- MENZE, M.A.; HUTCHINSON, K.; LABORDE, S.M.; HAND, S.C. 2005. Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R68-R76.
- MENZE, M.A.; FORTNER, G.; NAG, S.; HAND, S.C. 2010. Mechanisms of apoptosis in Crustacea: what conditions induce versus suppress cell death? *Apoptosis* 15, 293-312.
- MIGUEL, N.C.O.; WAJSENZON, I.J.R.; TAKIYA, C.M.; ANDRADE, L.R.; TORTELOTE, G.G.; EINIKER-LAMAS, M.; ALLODI, S. 2007. Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell Tissue Research* 329, 159-168.
- MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; SCOTT, A.; MURRAY, D. 2012. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 1-16.
- MOURET, S.; CHARVERON, M.; FAVIER, A.; CADET, J.; DOUKI, T. 2008. Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin. *DNA Repair* 7, 704-712.
- 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 Ratoles, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 16, 629-636.
- MÜLLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M.; SIMÕES-COSTA, M.S. 2003. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 23, 869-875.
- NAZARI, E.M.; SIMÕES-COSTA, M.S.; MULLER, Y.M.R.; AMMAR, D.; DIAS, M. 2003. Comparisons of fecundity, egg size and egg mass volume on the freshwater prawns *Macrobrachium potiana* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology* 23, 862-868.
- NAZARI, E.M. 2010. Alterações morfológicas e celulares induzidas pela radiação ultravioleta B em embriões do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*. Tese de Doutorado em Ciências Morfológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, 140p.
- NAZARI, E.M.; AMMAR, D.; FABRO, A.B.; LATINI, A.; MULLER, Y.M.R.; ALLODI, S. 2010. Effects of environmental and artificial UV-

- B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquatic Toxicology* 98, 25-33.
- NAZARI, E.M.; AMMAR, D.; MÜLLER, Y.M.R.; ALLODI, S. 2013. Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. In: ALLODI, S.; NAZARI, E.M. (Eds), *Exploring themes on aquatic toxicology*. Research Signpost 103-118p.
- NICOLAOU, A.; PILKINGTON, S.M.; RHODES, L.E. 2011. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chemistry and Physics of Lipids* 164, 535-543.
- OONINCX, D.G.A.B.; STEVENS, Y.; VAN DEN BORNE, J.J.G.C.; VAN LEEUWEN, J.P.T.M.; HENDRIKS, W.H. 2010. Effects of vitamin D supplementation and UVb exposure on the growth and plasma concentration of vitamin D metabolites in juvenile bearded dragons *Pogona vitticeps*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 156, 122-128.
- OPFERMAN, J.T.; KORSMEYER, S.J. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology* 4, 410-415.
- ORCE, V.L.; HELBLING, W.E. 1997. Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the 'ozone hole'. *Global and Planetary Change* 15, 113-121.
- PAUL, N.D.; GWYNN-JONES, D. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 48-55.
- PETERS, A.C.; YOUNG, L.C.; MAEDA, T.; TRON, V.A.; ANDREW, S.E. 2003. Mammalian DNA mismatch repair protects cells from UVB-induced DNA damage by facilitating apoptosis and p53 activation. *DNA Repair* 2, 427-435.
- PFEIFER, G.P.; YOU, Y.H.; BESARATINIA, A. 2005. MUTATIONS INDUCED BY ULTRAVIOLET LIGHT. *MUTATION RESEARCH* 571, 19-31.
- PIETENPOL, J.A.; STEWART, Z.A. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181, 475-481.
- POLEFKA, T.G.; MEYER, T.A.; AGIN, P.P.; BIANCHINI, R.J. 2012. Effects of solar radiation on the skin. *Journal of cosmetic dermatology* 11, 134-143.

- PREVIDI, M.; POLVANI, L.M. 2014. Climate system response to stratospheric ozone depletion and recovery. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 140, 2401-2419.
- PRZESLAWSKI, R. 2005. Combined effects of solar radiation and desiccation on the mortality and development of encapsulated embryos of rocky shore gastropods. *Marine Ecology Progress Series* 298, 169–177.
- RATHJEN, A.K.; BREITBURG, D.L.; NEALE, P.J. 2012. Effects of ultraviolet radiation on the growth, reproduction and survival of the lobate ctenophore *Mnemiopsis leidy* in Chesapeake Bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 432, 121-130.
- ROOS, W.P.; KAINA, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 12, 440-450.
- ROMERO, A.; ESTEVEZ-CALVAR, N.; DIOS, S.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. 2011. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6, e17003.
- ROWLAND, S.F. 2006. Stratospheric ozone depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361, 769-790.
- RUELAS, D.S.; KARENTZ, D.; SULLIVAN, J.T. 2006. Lethal and sub-lethal effects of UVB on juvenile *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Journal of Invertebrate Pathology* 93, 192-200.
- SCHOLTZ, G.; PATEL, N. H.; DOHLE, W. 1994. Serially homologous engrailed stripes are generated via different cell lineages in the germ band of amphipod crustaceans (Malacostraca, Peracarida). *The International Journal of Developmental Biology* 38, 471-478.
- SCHUCH, A.P.; GUARNIERI, R.A.; ROSA, M.B.; PINHEIRO, D.K.; MUNAKATA, N.; SCHUCH, N.J. 2006. Comparisons of biologically effective doses of solar UV-radiation determined with spore dosimetry and spectral photometry in 2000-2003 at Southern Space Observatory, Brazil. *Advances in Space Research* 37, 1784-1788.
- SHANKLIN, J. 2010. Reflections on the ozone hole. *Nature* 465, 34-35.
- 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. *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 501-508.
- SMITH, R.C.; PREZELIN, B.B.; BAKER, K.E.A.; BIDIGARE, R.R.; BOUCHER, N.P.; COLEY, T.; MENZIES, D. 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255, 952-959.

- SOLA, Y.; LORENTE, J. 2015 Contribution of UVA irradiance to the erythema and photoaging effects in solar and sunbed exposures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 143, 5-11.
- SUZUKI, K.; KOSTIN, S.; PERSON, V.; ELSÄSSER, A.; SCHAPAER, J. 2001. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33, 983-994.
- TEIJIDO, O.; DEJEAN, L. 2010. Upregulation of Bcl 2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria. *FEBS letters* 584, 3305-3310.
- THURBER, R.V.; EPEL, D. 2007. Apoptosis in early development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology* 303, 336-346.
- TIETGE, J.E.; DIAMOND, S.A.; ANKLEY, G.T.; DEFOE, D.L.; HOLCOMBE, G.W.; JENSEN, K.M.; HAMMER, E. 2001. Ambient solar UV radiation causes mortality in larvae of three species of *Rana* under controlled exposure conditions. *Photochemistry and Photobiology* 74, 261-268.
- TIMARES, L.; KATIYAR, S.K.; ELMETS, C.A. 2008. DNA Damage, apoptosis and langerhans cells-activators of UV-induced immune tolerance. *Photochemistry and Photobiology* 84, 422-436.
- TOMICIC, M.T.; CHRISTMANN, M.; KAINA, B. 2005. Apoptosis in UV-C light irradiated p53 wild-type, apaf-1 and p53 knockout mouse embryonic fibroblasts: interplay of receptor and mitochondrial pathway. *Apoptosis* 10, 1295-1304.
- WANG, P.H.; WAN, D.H.; CHEN, Y.G.; WENG, S.P.; YU, X.Q.; HE, J.G. 2013. Characterization of four novel caspases from *Litopenaeus vannamei* (Lvcaspase2-5) and their role in WSSV infection through dsRNA-mediated gene silencing. *PLoS one* 8, e80418.
- WIDEL, M.; KRZWON, A.; GAJDA, K.; SKONIECZNA, M.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. 2014. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 68, 278-287.
- WON, E.J.; LEE, Y.; HAN, J.; HWANG, U.K.; SHIN, K.H.; PARK, H.G.; LEE, J.S. 2014. Effects of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclopsina nana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 165, 60-66.
- WU, M.H.; JIN, X.K.; YU, A.Q.; ZHU, Y.T.; LI, D.; LI, W.W.; WANG, Q. 2014. Caspase-mediated apoptosis in crustaceans: Cloning and

- functional characterization of EsCaspase-3-like protein from *Eriocheir sinensis*. *Fish and Shellfish Immunology* 41, 625-632.
- YANG, W. 2011. Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Science* 20, 1781-1789.
- YOUNG, A.R. 2006. Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92, 80-85.
- XIANG, Z.; QU, F.; WANG, F.; XIAO, S.; JUN, L.; ZHANG, Y.; YU, Z. 2015. Bax/Bak as key regulators of the mitochondrial apoptotic pathway: cloned and characterized in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunology* 42, 225-232.
- ZENG, J.P.; BI, B.; CHEN, L., YANG, P., GUO, Y., ZHOU, Y.Q., LIU, T.Y. 2014. Repeated exposure of mouse dermal fibroblasts at a sub-cytotoxic dose of UVB leads to premature senescence: A robust model of cellular photoaging. *Journal of Dermatological Science* 73, 49-56.
- ZENI, E.C. 2013. Estudo da capacidade de reparo celular aos danos causados pela radiação em embriões do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 85p.
- ZHOU, L.; STELLER, H. 2003. Distinct pathways mediate UV-Induced apoptosis in *Drosophila* embryos. *Developmental Cell* 4, 599-605.