

**Valquíria Machado Cardoso Weiss**

**Efeitos da radiação ultravioleta B na dinâmica celular do epitélio  
dos túbulos do hepatopâncreas de juvenis do camarão  
*Macrobrachium olfersi* (Wiegman, 1836)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra Yara Maria Rauh Müller

Coorientador: Prof. Dr. Dib Ammar

Florianópolis  
2015

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

Weiss, Valquíria Machado Cardoso

Efeitos da radiação ultravioleta B na dinâmica celular do epitélio dos túbulos do hepatopâncreas de juvenis do camarão *Macrobrachium olfersi* (Wiegman, 1836) / Valquíria Machado Cardoso Weiss ; orientadora, Yara Maria Rauh Müller ; coorientador, Dib Ammar. - Florianópolis, SC, 2015.  
96 p.

Tese (doutorado) - 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 UV-B. 3. Hepatopâncreas. 4. Camarão *Macrobrachium olfersi*. I. Müller, Yara Maria Rauh. II. Ammar, Dib . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.





## **AGRADECIMENTOS**

Aos orientadores, professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, aos órgãos financiadores CAPES e Projeto Ciências do Mar, à UFSC, aos colegas e aos familiares.



## RESUMO

O hepatopâncreas é um órgão digestivo presente nos crustáceos, como os camarões *Macrobrachium olfersi* e possui papel fundamental nos sistemas metabólicos, bem como na resposta imunológica e nos processos de maturação gonadal e reprodução, além de apresentar alta sensibilidade às mudanças ambientais. Tendo em vista as alterações celulares causadas pela radiação e que estudos analisando os efeitos da radiação UV-B no hepatopâncreas ainda não estão disponíveis na literatura, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da radiação UV-B sobre a organização e dinâmica do epitélio dos túbulos do hepatopâncreas de juvenis de *M. olfersi*. Os juvenis foram expostos à radiação UV-B simulada e a organização e distribuição das células epiteliais do hepatopâncreas foram analisadas, assim como a presença celular de polissacarídeos e lipídios através de análises histoquímicas; o perfil de proliferação e morte nos túbulos do hepatopâncreas por imunohistoquímica; a integridade de membranas e organelas celulares, por análises ultraestruturais. O epitélio do hepatopâncreas dos grupos controle e tratado apresentaram quatro tipos celulares (células E, R, F e B) e, ainda, um quinto tipo, a célula M. A célula fonte do epitélio, a célula E, mostrou a capacidade de se dividir nas três zonas do túbulo do hepatopâncreas. A radiação UV-B induziu à alteração do perfil de proliferação das células epiteliais do hepatopâncreas e levou ao aumento da expressão da caspase-3, desorganização epitelial do hepatopâncreas, diminuição da homogeneidade citoplasmática, aumento da presença de vacúolos e maior frequência e volume das células B. A produção e armazenamento de polissacarídeos aumentaram, já as dos lipídios diminuíram. Ocorreram alterações ultraestruturais nas células R e F, como: condensação da heterocromatina próxima ao envelope nuclear, perda das cristas mitocondriais, diminuição dos ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso, dilatação das cisternas do complexo de Golgi, aumento de componentes autofágicos e, ainda, alteração na estrutura das microvilosidades. Diante dessas observações, foi analisada a expressão das proteínas Drp1 e PCNA, relacionadas com estresse celular. Os resultados mostraram que a radiação UV-B induziu o aumento da expressão dessas proteínas, indicando o comprometimento da dinâmica mitocondrial, das funções celulares e prejudicando a viabilidade celular. Os dados obtidos mostraram que o hepatopâncreas é um órgão adequado para estudos sobre os efeitos da radiação UV-B e que o estresse causado nas organelas das células epiteliais pela irradiação levou à formação de componentes autofágicos e à morte

celular, alterando as diversas funções celulares do epitélio do hepatopâncreas.

**Palavras-chave:**

UV-B 1; toxicidade celular 2; morte celular 3; dano mitocondrial 4; hepatopâncreas 5; ultraestrutura 6; histoquímica 7; *Macrobrachium olfersi* 8.



## ABSTRACT

The hepatopancreas is a digestive organ present in crustaceans such, as the prawn *Macrobrachium olfersi*, and have key role in various metabolic systems, as well as in the immune response and gonadal maturation and reproductive processes, showing high sensitivity to environmental changes. Considering the major changes to radiation in cells and that no studies available in the literature has verified the effects of UV-B radiation in the hepatopancreas, the objective of this work was to evaluate the toxicity of UV-B radiation on the organization and dynamics of the hepatopancreas tubules epithelium of juvenile *M. olfersi*. The juveniles were exposed to simulated UV-B irradiation and the organization and distribution of the epithelial cells were analyzed, as well as cellular presence of polysaccharides and lipids by histochemical analysis; regions of proliferation and death in the tubules of the hepatopancreas by immuno-histochemistry; integrity of membranes and organelles by ultrastructural analysis. The four cell types (E, R, F, and B-cell) as well as a fifth cell type, the M cell, were identified in the hepatopancreas' epithelium of control and treated groups. It was also observed that the cell source of the epithelium, the E cell, can divide itself into the three zones of the hepatopancreas tubule. UV-B radiation induced change in the profile of the epithelial cells proliferation of hepatopancreas and induced increased caspase-3 expression; epithelial disorganization of hepatopancreas; cells showed a decrease in cytoplasmic homogeneity, increased presence of vacuoles and increased frequency and volume of B cells. The production and storage of polysaccharides increased while the lipids decreased. Ultrastructural changes occurred in R and F cells, such as: heterochromatin condensation near to the nuclear envelope, loss of mitochondrial crests, and reduction of ribosomes associated with the rough endoplasmic reticulum, dilation of the Golgi cisterns, increased autophagic components and, furthermore change in the structure of the microvilli. In face of these observations, was analyzed the expression of Drp1 and PCNA, proteins related to cell stress. Results showed that UV-B radiation induced the increased expression of these proteins, indicating impairment of mitochondrial dynamics, cell functions and impairing cell viability. Data obtained in this study showed that the hepatopancreas is a suitable organ for studies on the effects of UV-B radiation and that the stress caused in the organelles of epithelial cells by irradiation led to the formation of autophagic components and cell death, impairing various cellular functions in the hepatopancreas epithelium.

**Keywords:**

UVB 1; cell toxicity 2; cell death 3; mitochondrial damage 4; hepatopancreas 5; ultrastructure 6; histochemistry 7; *Macrobrachium olfersi* 8.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do desenvolvimento do tubo digestivo do Decapoda <i>Maja squinado</i> .....	20
Figura 2 – Esquema de decápode, localizando o hepatopâncreas e detalhe de um túbulo em visão longitudinal.....	22
Figura 3 – <i>Macrobrachium olfersi</i> juvenil e hepatopâncreas.....	32
Figura 4 – Biometria nas células do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	33
Figura 5 – Secções do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	38
Figura 6 – Caracterização das células E, M e R do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	40
Figura 7 - Caracterização das células F e B do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	40
Figura 8 - Alterações observadas nas células epiteliais do túbulo do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> na zona medial, após a radiação com UV-B.....	41
Figura 9 - Morfometria das células epiteliais do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	42
Figura 10 - Efeito da radiação UV-B na produção dos polissacarídeos ácidos e neutros nos hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	43
Figura 11 - Densidade Integrada da reação positiva de polissacarídeos ácidos e neutros nos hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	44
Figura 12 - Efeito da radiação UV-B nos lipídios dos hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	43
Figura 13 - Detalhe das marcações lipídicas nas células epiteliais do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	46
Figura 14 - Detalhe das marcações lipídicas nos vacúolos das células epiteliais do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	47
Figura 15 - Secções do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> mostrando células E em proliferação.....	48
Figura 16 - Média das células E em mitose nas zonas distal, medial e proximal do túbulo do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> dos grupos controle e irradiado, obtido pela imunolocalização da proteína PHH3.....	48
Figura 17 - Imuno-histoquímica para morte celular por apoptose no hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	49
Figura 18 - Fissão mitocondrial nas células epiteliais do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	50
Figura 19 - Imuno-histoquímica para PCNA no hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	51

Figura 20 - Cortes semifinos dos hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	52
Figura 21 - Ultraestrutura das células R e F do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> , grupo controle.....	53
Figura 22 - Secções ultrafinas das células F do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	54
Figura 23 - Alterações citoplasmáticas das células F do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	55
Figura 24 - Secções ultrafinas das células R do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	58
Figura 25 - Secções ultrafinas das células R do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	59
Figura 26 - Secções ultrafinas das células R do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	60
Figura 27 - Ultraestrutura da célula B do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> , grupo controle.....	62
Figura 28 - Ultraestrutura da célula B do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> , grupo controle e irradiado.....	62
Figura 29 - Secções ultrafinas do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> mostrando o detalhe da lâmina basal (lb).....	63
Figura 30 - Esquema apresentando os resultados obtidos neste trabalho sobre o efeito toxicológico da radiação UV-B nas células epiteliais do hepatopâncreas de <i>Macrobrachium olfersi</i> .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- adenosina trifosfato
AT-O	- Azul de Toluidina
B	- célula secretora
CAT	- catalase
CFCs	- clorofluorcarbonos
DNA	- ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DRP1	- do inglês, <i>Dynammin-Related Protein 1</i>
E	- célula embrionária
F	- célula F
G3P	- gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	- do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GST	- glutadiona s-transferase
GTP	- trifosfato de guanosina
HE	- hematoxilina-eosina
HFCs	- hidrofluorcarbonos
LRDA	- Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
M	- célula basal
mtDNA	- DNA mitocondrial
PAS	- do inglês, <i>Periodic Acid Schiff</i>
PBS	- tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PC	- papila caudal
PCNA	- do inglês, <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PHH3	- fosfohistona H3
R	- célula reabsortiva
REL	- retículo endoplasmático liso
RER	- retículo endoplasmático rugoso
UV	- ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	17
1.2 CARACTERÍSTICAS DO HEPATOPÂNCREAS.....	20
1.3 JUSTIFICATIVA.....	27
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
<b>2.1.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 ANIMAIS .....	31
3.2 TRATAMENTO.....	31
<b>3.2.1 Procedimento de irradiação.....</b>	<b>31</b>
3.3 MICROSCOPIA DE LUZ.....	32
<b>3.3.1 Morfologia e morfometria.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2 Histoquímica.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.3 Imuno-histoquímica.....</b>	<b>34</b>
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	35
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA E DA DINÂMICA CELULAR NO HEPATOPÂNCREAS.....	37
4.2 ANÁLISES DOS POLISSACARÍDEOS E LIPÍDIOS NO EPITÉLIO TUBULAR DO HEPATOPÂNCREAS.....	42
4.3 PERFIL DE PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE DAS CÉLULAS EPITELIAIS DO HEPATOPÂNCREAS.....	47
4.4 ANÁLISES DAS PROTEÍNAS DE ESTRESSE CELULAR INDUZIDAS PELA RADIAÇÃO UV-B.....	49

4.4 ANÁLISES DAS MEMBRANAS E ORGANELAS CELULARES.....	51
<b>4.5.1 Descrição das células R, F e B do grupo controle e irradiado.</b>	<b>52</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A radiação ultravioleta (UV) corresponde a 7% do espectro solar que atinge a superfície terrestre. Esta radiação é fotobiologicamente ativa, ou seja, possui energia suficiente para penetrar nas células e induzir reações químicas. A radiação UV está classificada em três faixas de comprimento de onda: radiação UV-A (400 – 320 nm), UV-B (320 – 290 nm) e UV-C (290 – 200 nm) (Diffey, 2002; Maverakis et al. 2010).

A radiação UV-A atinge a superfície terrestre em maior abundância, chegando a 95%, porém é a menos energética; a radiação UV-B atinge de 5% a 10%; já a radiação UV-C, a mais energética, chega a quantidades insignificantes na superfície terrestre (D'Orazio et al. 2013). A camada de ozônio, presente na estratosfera, é a região aonde os níveis de radiação UV que chegam aos ambientes terrestres são controlados, através de reações fotoquímicas pelas quais a radiação UV dissocia as moléculas de oxigênio em dois átomos livres de oxigênio. A radiação UV-A não participa dessa reação fotoquímica devido a sua baixa energia; a radiação UV-B participa apenas em parte dessa reação; e a energia da radiação UV-C é praticamente toda atenuada na camada de ozônio (Kirchhoff et al. 2000).

A radiação UV-B é a mais efetiva em relação aos efeitos que podem ser induzidos nos organismos, pois sua energia pode penetrar nas células. Estudos mostraram que a radiação UV-B é capaz de causar danos diretamente às moléculas celulares, como DNA, proteínas e lipídios (Lesser, 2010; Zubrzycki et al. 2012).

Os níveis da radiação UV-B têm aumentado na superfície terrestre devido às atividades industriais e agrícolas e esta alteração ambiental pode ter influência significativa nos organismos e ecossistemas (Molina e Rowland, 1974; Shanklin, 2010; Häder et al. 2011). As emissões de halogenados voláteis, como hidrofluorcarbonos (HFCs), clorofluorcarbonos (CFCs), entre outros provenientes dessas atividades, colaboram para uma atmosfera rica em compostos químicos altamente reativos. Na estratosfera, esses compostos são dissociados pelas radiações UV-C e UV-B liberando a molécula de cloro que se liga às moléculas de oxigênio, impedindo a formação do ozônio e permitindo que níveis maiores de radiação UV-B atinjam os ambientes terrestres (Karsten, 2008; McKenzie et al. 2011).

A incidência da radiação UV-B na superfície terrestre entre os anos de 1980 e 2000 aumentou de 6% a 14% (*World Meteorological*

*Organization; United Nations Environment Programme*, 2002), apesar dos esforços globais, os quais seguem protocolos que determinam a diminuição da emissão desses gases (*United Nations Environment Programme*, 2000). Em 2011 foi registrada a maior taxa de degradação de ozônio sobre a Antártica (Manney et al. 2011) e dados recentes mostram que os níveis de HFCs na atmosfera continuam aumentando (*World Meteorological Organization*, 2014). Esse conjunto de informações contribuiu para o desenvolvimento de estudos voltados para a compreensão dos efeitos da radiação UV-B nos organismos (Maverakis et al. 2010; Llabrés et al. 2012; Olson e Barbieri, 2014).

Nos ambientes aquáticos, o nível de penetração da radiação UV-B está relacionado com a quantidade de substâncias em suspensão na água, como partículas de matéria inorgânica, carbono orgânico e substâncias húmicas, as quais contribuem para a atenuação dos efeitos da radiação UV-B. Essas substâncias podem ser degradadas em subunidades pela ação da radiação UV-B, sendo então consumido pelo bacterioplâncton, o que contribui diretamente para a transparência da água e indiretamente, para o aumento dos efeitos da radiação UV-B nos organismos (Kuwahara et al. 2000; Häder et al. 2003).

A maior incidência da radiação UV-B nos ambientes aquáticos levou ao aumento da taxa de mortalidade dos animais como peixes e crustáceos em ambiente natural (Llabrés et al. 2012). Em especial, nos crustáceos ocorreram: diminuição da taxa de eclosão em *Calanus finmarchicus* (Rodriguez et al. 2000) e *Acartia omorii* (Lacuna e Uye, 2001); redução da motilidade das larvas em *Cyrtograpsus altimanus* (Moresino et al. 2011); alterações morfológicas externas e estresse oxidativo em embriões de *Macrobrachium olfersi* (Nazari et al. 2010); dano ao DNA em *Cyclops abyssorum taticus* (Tartarotti et al. 2014); alterações em proteínas relacionadas com o metabolismo em *Tigriopus japonicus* (Zubrzycki et al. 2012); alterações no perfil mitocondrial nas células embrionárias de *M. olfersi* (Quadros, 2015); e, alterações em proteínas envolvidas na proliferação celular, como a PHH3 (proteína histona H3 fosforilada) e no ciclo celular, como PCNA (do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*) em embriões de *M. olfersi* (Zeni et al. 2015). A histona H3 é fosforilada especificamente durante a mitose e meiose, em diferentes fases da divisão celular e em diferentes organismos, sendo utilizada como marcador mitótico (Wei et al. 1999; Hans e Dimitrov, 2001). A proteína PCNA apresenta funções e sequência genética altamente conservativa e atua em importantes vias no metabolismo dos ácidos nucleicos, atuando em diversos processos como replicação e reparo do DNA e regulação do ciclo celular (Kelman, 1997;

Li et al. 2010). Essa proteína também é encontrada, além de no núcleo, na mitocôndria, no citoplasma e no citoesqueleto e desempenha funções celulares no compartimento citoplasmático (Li et al. 2010).

Os efeitos da radiação UV-B também foram verificados por dano ao DNA em *Colossoma macropomum* e *Arapaima gigas* (Peixe) (Groff et al. 2010); alterações de proteínas em *Strongylocentrotus purpuratus* (Equinoderma) (Campanale et al. 2011; Adams et al. 2012); e, formação de radicais livres e *up-regulation* ou *down-regulation* de genes em *Brachionus* sp. (Rotifera) (Kim et al. 2011).

*Macrobrachium olfersi* é utilizado como modelo experimental em estudos desenvolvidos no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA)/BEG/CCB/UFSC. Estes animais são encontrados na Lagoa do Peri, um importante habitat para diferentes espécies aquáticas e a maior Unidade de Conservação de Florianópolis - SC (Centro de Estudos Cultura e Cidadania, 1996). Este local apresenta águas claras, fundo arenoso, pouca vegetação aquática, o que confere ao ambiente muita luminosidade, ou seja, fácil penetração da radiação UV-B. Medidas da luz solar natural realizadas em dias ensolarados de verão na Ilha de Santa Catarina constataram que a irradiação varia entre 2,2 a 3,5 W.m<sup>-2</sup>, baseados no índice UV-B diário que varia de 9 a 14 durante a estação de verão (Schmidt et al. 2012).

Estudos sobre as características da biologia reprodutiva (Müller et al. 1996; Ammar et al. 2001; Nazari et al. 2003) e do desenvolvimento (Müller et al. 2003; 2004; Simões-Costa et al. 2005) de *M. olfersi* foram publicados pelo grupo do LRDA, além de estudos sobre a organização do sistema nervoso (Ammar et al. 2008; 2013) e os impactos da radiação UV-B em embriões aquáticos (Nazari et al. 2013). Em estudos recentes, foram avaliados os efeitos das radiações UV-A e UV-B em embriões de *M. olfersi*, sendo observadas alterações nos mecanismos de proliferação celular, ciclo celular, morte celular (Cardoso, 2011; Quadros, 2015; Schramm, 2015) e danos ao DNA (Zeni et al. 2015).

*Macrobrachium olfersi* é uma espécie de camarão que apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a costa da Flórida nos Estados Unidos até o extremo sul da América do Sul (Holthuis, 1980). Esta espécie é endêmica da Ilha de Santa Catarina, encontrada nas margens de lagoas, rios e canais (Müller e Prazeres, 1992) onde se abrigam entre as rochas e/ou vegetação submersa (Montoya, 2003). Estes camarões apresentam porte médio, onde os machos exibem comprimento médio de 49,65 mm e o peso médio de 3,79 g, já as fêmeas apresentam comprimento médio de 38,75 mm e peso médio de 1,61 g (Ammar et al. 2001). As fêmeas de *M. olfersi* atingem a

maturidade sexual com 21,2 mm de comprimento total e em média carregam 1440 ovos na câmara incubadora (Müller et al. 1996; Ammar et al. 2001).

O desenvolvimento de *M. olfersi* ocorre em tempo médio de 14 dias (24°C) e nos ovos ricos em vitelo, ocorre a clivagem parcial, onde apenas parte do ovo originará o embrião (Müller et al. 2003). Nesse modelo de clivagem, o processo de gastrulação tem início com a internalização das células através da área blastoporal, constituindo a massa mesentodérmica que, posteriormente, se diferenciará em mesoderma e endoderma, já as células que permanecem na superfície constituem o ectoderma e a partir desses três folhetos, originará todas as estruturas do embrião.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DO HEPATOPÂNCREAS

A organização do intestino médio e do hepatopâncreas segue um padrão semelhante nos crustáceos que apresentam ovos rico em vitelo, como descrito por Lang (1973) no caranguejo *Maja squinado* (Figura 1). O ectoderma contribuirá para a formação do intestino anterior e posterior, já o endoderma é constituído pelos vitelófagos e pela placa endodérmica, sendo que essa última originará o intestino médio e a glândula digestiva, chamada de hepatopâncreas (Müller, 1984).

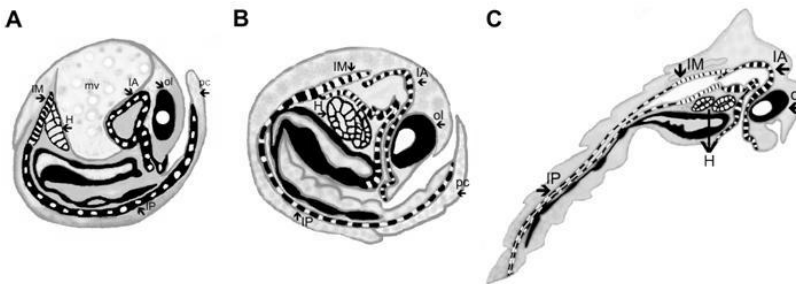


Figura 1: Esquema do desenvolvimento do tubo digestivo do Decapoda *Maja squinado*. Embrião em secção sagital, mostrando o intestino anterior (IA) e posterior (IP) e o intestino médio (IM) em (A-C). Massa de vitelo (mv) e o hepatopâncreas (H). ol = olho; pc = papila caudal. (Fonte: Adaptado de Lang, 1973).

O hepatopâncreas apresenta epitélio cilíndrico pseudoestratificado com microvilosidades, células secretoras e absorptivas (Franceschini-Vicentini et al. 2009), características estas

relacionadas à origem endodérmica dessas células. Durante o desenvolvimento larval e pós-larval, o intestino anterior passa por mudanças morfológicas buscando se adaptar aos diferentes tipos de alimentos (Queiroz et al. 2011).

O hepatopâncreas está localizado no cefalotórax, ventral à gônada e anterodorsal ao estômago (Cuartas et al. 2002) (Figura 2 A). Ele está organizado em uma rede de ductos e túbulos em fundo cego (Figura 2 B). Na região entre os túbulos se observa a presença do tecido conjuntivo frouxo, hemócitos, vasos e células miofibrilares assentadas na membrana basal (Franceschini-Vicentini et al. 2009). Cada túbulo do hepatopâncreas pode ser subdividido em zona distal, medial e proximal em relação ao túbulo central do órgão (Figura 2 C). O epitélio tubular dos crustáceos é originado do endoderma e é composto por quatro diferentes tipos celulares: célula embrionária (E), célula reabsortiva (R), célula fibrilar (F), célula secretora (B, *do inglês Blister*). Em algumas espécies, um quinto tipo celular está presente, a célula basal (M, *do inglês Midget*) (Al-Mohanna e Nott, 1987a; Ramadevi et al. 1990; Nunes et al. 2014).

Estudos se basearam nas características morfológicas como formato da célula, posição do núcleo, presença de vacúolos e pela disposição das células nas diferentes zonas dos túbulos do hepatopâncreas para descreverem as células epiteliais. As células apresentam um dinamismo no túbulo do hepatopâncreas, amadurecendo a medida que migram na direção da zona proximal. As células E são localizadas na zona distal, em direção à zona medial encontram-se as células F, R e M, as quais também estão localizadas na zona proximal. A partir do final da zona medial e, principalmente, na zona proximal, são localizadas as células B (Al-Mohanna e Nott, 1987b; 1989).

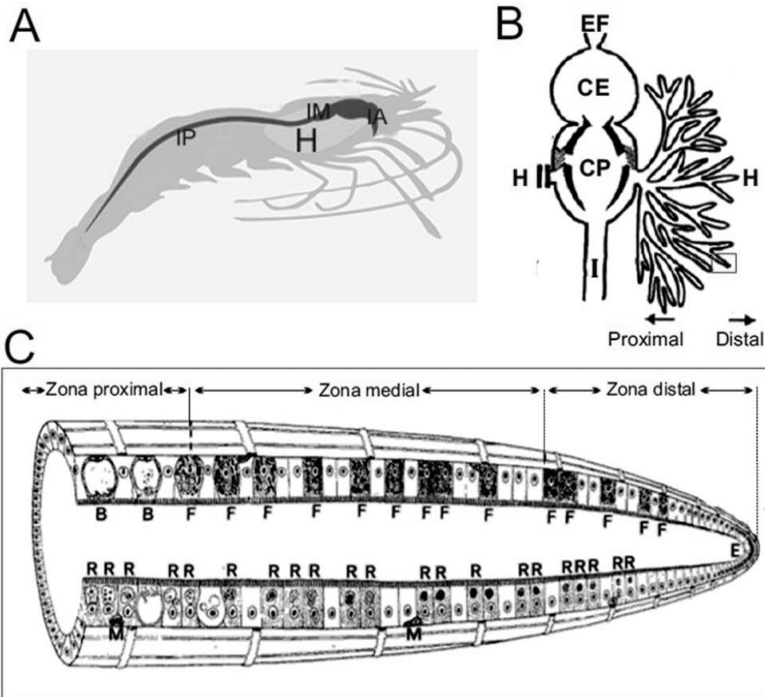


Figura 2: Esquema de decápode, localizando o hepatopâncreas e detalhe de um túbulo em visão longitudinal. Em (A), hepatopâncreas (H) de camarão localizado na região do intestino médio (IM), entre o intestino anterior (IA) e posterior (IP). Em (B), detalhe do tubo digestório de *Ucides cordatus*, dividido em esôfago (EF), câmara estomacal (CE), câmara pilórica (CP) e intestino posterior (I). Essa representação mostra apenas uma parte da glândula digestiva e localiza a região distal e proximal. O quadro vermelho destaca parte de um túbulo visto em maior aumento em (C). Localização das zonas distal, medial e proximal do túbulo e das células B (B), célula M (M), célula F (F), célula R (R) e células E (E) de *Penaeus semisulcatus*. (Fonte: Adaptado de Coutteau e Goossens, 2013 (A); Corrêa et al. 2002 (B); Al-Mohanna e Nott, 1989 (C)).

O hepatopâncreas é um importante órgão para o metabolismo dos crustáceos, pois atuam na regulação do metabolismo de aminoácidos, carboidratos, lipídios, glicogênio e vitaminas. Sua principal função está relacionada com a digestão, sintetizando e secretando enzimas digestivas e absorvendo e reservando nutrientes (Weel, 1973; Ceccaldi, 1989). As reservas nutritivas armazenadas no hepatopâncreas são mobilizadas para a demanda de diferentes funções fisiológicas, como o crescimento, locomoção, regulação osmótica, reprodução, excreção,

defesa imunológica e resposta a mudanças ambientais (Loizzi, 1971; Al-Mohanna e Nott, 1989; Bhavan e Geraldine, 2001; Castiglioni et al. 2006; Li et al. 2013).

Os tipos celulares que constituem o epitélio tubular deste órgão são fundamentais para essa diversidade de funções que o hepatopâncreas desempenha. No processo digestivo, as células F sintetizam grânulos de zimogênio e os secretam no lúmen do túbulo para que sejam transportados ao estômago e ocorra a digestão extracelular. Posteriormente, estas células absorvem o material para a digestão intracelular e diferenciam-se em célula B (Al-Mohanna et al. 1985a; Zilli et al. 2003). Algumas células apresentam um vacúolo apical com enzimas hidrolíticas, o qual também é secretado no lúmen (Loizzi e Peterson, 1971). Porém, o material solúvel é absorvido e digerido principalmente pela célula B. Os nutrientes são ingeridos por endocitose, formando um grande vacúolo digestivo, o qual é eliminado por secreção holócrina na fase final da digestão intracelular e assimilação (Al-Mohanna e Nott, 1987b; Franceschini-Vicentini et al. 2009).

As células R absorvem nutrientes do lúmen e pequenas partículas da hemolinfa, apresentando vacúolos apicais contendo partículas e vesículas junto com carbonato de cálcio e lipídios. As reservas nutritivas são hidrolisadas nos vacúolos e transportadas pelo retículo endoplasmático rugoso para a hemolinfa. As células R entram em senescência quando estão adjacentes às células B, as quais também estão sendo extrudadas do epitélio (Al-Mohanna e Nott, 1987b). As células E são responsáveis pela renovação do epitélio, podendo se diferenciar nas células R ou F, sendo que essa última se diferencia posteriormente na célula B (Al-Mohanna et al. 1985a; Zilli et al. 2003). No final do ciclo digestivo, as células E dividem-se por mitose, repondo as células R e B degeneradas (Al-Mohanna et al. 1985a). As células M sintetizam e reservam material proteico, como glicoproteínas e também glicogênio, porém em menor quantidade. As proteínas obtidas da hemolinfa são estocadas em um denso vacúolo, sendo utilizadas antes e após a muda, assim como na manutenção celular (Al-Mohanna et al. 1987a; 1989; Ramadevi et al. 1990; Franceschini-Vicentini et al. 2009).

Estão presentes nas células epiteliais do hepatopâncreas diferentes tipos de enzimas digestivas. Os vacúolos das células F e B contêm amilases, proteases, lipases e esterases. Já as células R contêm lipases e esterases no citoplasma (Loizzi e Peterson, 1971; López-López et al. 2003; Nolasco et al. 2006).

As células que compõem os túbulos do hepatopâncreas também secretam e/ou absorvem polissacarídeos através da borda microvilar (Loizzi, 1971; Nunes et al. 2014). A ocorrência de mucossustâncias é uma característica comum das células epiteliais digestivas (Díaz et al. 2008). Os polissacarídeos neutros estão presentes na membrana basal, no citoplasma das células R, B e nos vacúolos das células F e B (Loizzi, 1971; Nunes et al. 2014). Já os polissacarídeos ácidos estão presentes principalmente nos vacúolos das células R (Nunes et al. 2014).

As reservas nutritivas do hepatopâncreas, como cálcio, lipídios, carboidratos e proteínas são metabolizadas para o crescimento e desenvolvimento dos decápodes (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Sun et al. 2014). No ciclo de muda, ocorre a mobilização das reservas e absorção e liberação de cálcio para a formação de uma nova carapaça e crescimento dos tecidos (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Marcolin et al. 2008). Na maturação gonadal, os nutrientes do hepatopâncreas são utilizados para o desenvolvimento das gônadas (Castiglioni et al. 2006; Nunes et al. 2014).

Os açúcares são importantes para a vitelogênese no ovário e os lipídios são fundamentais durante a embriogênese, sendo a lipoproteína o principal componente proteico na maturação dos ovários e dos ovos (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Yamaguchi, 2001). Estão presentes ainda no hepatopâncreas hormônios esteroides, os quais influenciam a maturação das gônadas de fêmeas e machos de decápodes (Subramoniam, 2000; Montoya, 2010). Esses hormônios desencadeiam ações fisiológicas como: inibição ou estímulo da maturação da gônada; estímulo do crescimento; estímulo da muda; caracterização sexual masculina, espermatogênese nos testículos, caracterização sexual secundária masculina; promoção da vitelogênese; desenvolvimento dos ovos (Nagaraju, 2011; Warriner et al. 2001).

O hepatopâncreas também é importante na defesa imunológica, sendo o local de produção dos fatores de resposta imune (Gross et al. 2001; Deng et al. 2005). Além disso, contém células altamente especializadas e fagócitos localizados nas superfícies externas das arteríolas, as quais são capazes de remover patógenos. A estrutura do hepatopâncreas permite a liberação e a distribuição rápida de moléculas imunológicas (Johansson et al. 2000; Jiravanichpaisal et al. 2006). As células epiteliais do hepatopâncreas são a maior fonte de moléculas imunológicas, como lectinas, hemocianina, ferritina, proteínas antibacteriana e antiviral, enzimas proteolíticas e óxido nítrico (Roux et al. 2002; Alday-Sanz et al. 2002; Ji et al. 2009; Li et al. 2013; Roszer, 2014).



No hepatopâncreas ocorre ainda a biotransformação e acumulação de metais pesados e xenobióticos tóxicos (Bhavan e Geraldine, 2001; Mohd-Shamsudin et al. 2013) e este órgão também é considerado o maior centro metabólico responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (Arun et al. 1999; Li et al. 2008).

Nas células epiteliais, os íons metálicos podem: se associar com metalotioneína ou glutatona; ser transportados até a mitocôndria; ser acumulados nos lisossomos; ser transferidos para o retículo endoplasmático; ser mobilizados através da membrana celular basolateral para a hemolinfa (Viarengo et al. 1989; Mazzei et al. 2014). Grânulos contendo metais pesados são encontrados nas células epiteliais do hepatopâncreas em vesículas ligadas à membrana ou em vacúolos (Viarengo et al. 1989). Subsequentemente, através de exocitose celular o conteúdo vacuolar pode ser extrudado da célula, seguido pelo mecanismo excretório que deposita o metal no ambiente (Ahearn, Mandal e Mandal, 2004).

As células F e R que atuam nos processos de desintoxicação de xenobióticos e acúmulo de materiais inorgânicos, como metais pesados e outros compostos lipofílicos. No citoplasma celular ocorre a acumulação do material na forma solúvel e, em seguida, ocorre excreção (Anderson et al. 1997; Bhavan e Geraldine, 2001).

O hepatopâncreas tem sido alvo de estudos de toxicidade por ser capaz de responder rapidamente às mudanças ambientais e fisiológicas (Arun e Subramaniam, 1998; Díaz et al. 2010). Dentre essas respostas ao estresse ambiental, foram observadas em crustáceos, alterações na atividade das enzimas antioxidantes em *M. malcolmsonii* (Manosathiyadevan et al. 2013); alterações celulares, como mudança na organização do epitélio celular, formação de vacúolos celulares e alterações no complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndrias em *Metapenaeus dobsoni* (Sreeram e Menon, 2005).

Alterações relacionadas com morte celular foram encontradas em *Sinopotamon yangtsekiense* expostos ao cádmio, como condensação da cromatina próximo da membrana nuclear; ruptura da membrana mitocondrial; maior expressão da proteína caspase-3; e apoptose pela via mitocondrial (Liu et al. 2011). Alteração da mitocôndria, como a fissão mitocondrial normalmente está relacionada funções pró-apoptótica (Karbowski et al. 2003; Chan, 2006b) e a proteína Drp1 (do inglês, *Dynamin-Related Protein 1*) são componentes fundamentais para esse processo (Chang et al. 2010). As proteínas Drp1 são pequenos oligômeros encontrados na mitocôndria e no citosol (Smirnova et al. 2001) e regulam a fissão mitocondrial por mudança conformacional

dependente de trifosfato de guanosina (GTP) (Chang et al. 2010). Já a caspase-3 é uma proteína com função efetora da via apoptótica (McIlwain, Berger e Mak, 2013).

A presença de corpos residuais eletrodensos e alterações de membranas celulares, conhecidas como figuras mielínicas, foram observadas após exposição a poluentes aquáticos nas células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium borellii*, *Palaemonetes argentinus* (Collins, 2010) e *M. malcolmsonii* (Yamuna et al. 2009); e o aumento do número de autolisossomos ocorreu no hepatopâncreas de *Sinopotamon henanense* expostos ao cádmio (Liu et al. 2013; Liu, Yang e Wang, 2013). Os corpos residuais eletrodensos, figuras mielínicas e autolisossomos são componentes autofágicos que levam à autofagia (Chatterjee et al. 2014; Ryter, Mizumura e Choi, 2014). Autolisossomos são lisossomos secundários que atuam na digestão de materiais endógenos e que apresentam em seu vacúolo organelas celulares (Ghadially, 1988; Eskelinen, 2008). As figuras mielínicas são membranas com aparência espiral ou empilhada que podem ser encontradas dentro de corpos mielínóides, ou seja, envoltas por membrana. Esses corpos mielínóides são encontrados no citoplasma ou dentro dos autolisossomos (Ghadially, 1988) e estão envolvidas com a degeneração de organelas e membranas celulares devido à alteração lipídica causada por agente nocivo (Jao et al. 1983; Abraham, Hendy e Grasso, 1968). Os corpos residuais eletrodensos são materiais que não foram bem digeridos nos autolisossomos tardios (Ghadially, 1988). Eles estão relacionados com o envelhecimento celular, doenças ou inflamações nocivas, incluindo a quebra de mitocôndrias, glicogênio e lipídios (Travis & Travis, 1972; Ryter, Mizumura e Choi, 2014). Eles podem ser encontrados dentro de vacúolos dos corpos multivesiculados, os quais são vacúolos que podem conter também proteínas de membranas endocitadas que serão degradadas e substância celular exógena, em uma matriz densa ou clara (Ghadially, 1988; Alberts et al. 2008). Autofagia ocorre para manter a homeostase celular e reciclagem de nutrientes e para prover as necessidades metabólicas para a síntese de ATP (Huang e Klionsky, 2007; Chatterjee et al. 2014). A autofagia é estimulada por estresses fisiológicos, estresse oxidativo, hipóxia, estresse do retículo endoplasmático e sinais do sistema imunológico inato (Mizushima et al. 2008; Mizushima, 2010; Ryter e Choi, 2013).

Como foi mostrado, os estudos analisaram as respostas celulares do hepatopâncreas exposto aos agentes de estresse ambiental, como poluentes urbanos (Collins, 2010) e metais pesados (Liu et al. 2013), porém os efeitos que a radiação UV-B pode induzir no hepatopâncreas

não foram avaliados. Zubrzycki e colaboradores (2012), em estudo sobre as alterações proteicas ocorridas em crustáceos expostos à radiação UV-B, sugerem o hepatopâncreas como um importante órgão a ser avaliado nessas condições.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

A sensibilidade do hepatopâncreas em responder às mudanças ambientais (Bhavan e Geraldine, 2001; Collins, 2010), e o seu papel fundamental em diversos sistemas metabólicos (Sousa et al. 2005), motivaram a proposição deste estudo sobre os efeitos da radiação UV-B no hepatopâncreas do camarão juvenil *M. olfersi*.

Os indivíduos juvenis de camarão apresentam características que facilitam a identificação das alterações induzidas pelo agente estressor. Eles possuem carapaça transparente, a gônada em estágio imaturo e o hepatopâncreas, além de ser um modelo adequado para testes toxicológicos, apresenta uma organização com diferentes tipos celulares, permitindo realizar análises em diferentes funções celulares. Essas condições fazem com que o hepatopâncreas do juvenil seja um alvo da radiação UV-B e um bom modelo para estudos sobre os efeitos da radiação, pois mesmo sendo um órgão envolvido em diferentes funções metabólicas, nessa fase ele não está sendo influenciado pelos processos de reprodução.

*Macrobrachium olfersi* é uma potencial espécie monitora para sistemas aquáticos, apresentando população abundante; participando ativamente na cadeia alimentar; por ter ampla distribuição geográfica; apresentar alta fecundidade e desenvolvimento rápido; possuir tecidos capazes de bioacumular xenobióticos; habitar águas rasas onde estão susceptíveis aos efeitos nocivos da radiação UV.

O presente trabalho foi desenvolvido com base na hipótese de que a ação da radiação UV-B é capaz de atingir as células epiteliais do hepatopâncreas, levando a um estresse celular, o qual induz a alterações na estrutura e nas funções das células, levando à inviabilidade celular. Como consequência, são comprometidos a produção e o armazenamento de polissacarídeos e lipídios, bem como as diversas funções do hepatopâncreas.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a toxicidade da radiação ultravioleta B sobre a organização e dinâmica do epitélio dos túbulos do hepatopâncreas de juvenis de *M. olfersi*.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

- 1) Descrever a organização e distribuição dos diferentes tipos celulares do epitélio tubular do hepatopâncreas;
- 2) Caracterizar o efeito da UV-B sobre polissacarídeos e lipídios presentes no epitélio tubular do hepatopâncreas;
- 3) Identificar as regiões de proliferação e morte celular no epitélio tubular do hepatopâncreas e o efeito da radiação UV-B sobre esses mecanismos;
- 4) Verificar o efeito da UV-B sobre proteínas ativadas pelo estresse celular no epitélio do hepatopâncreas;
- 5) Identificar o efeito da radiação UV-B sobre a integridade de membranas e organelas celulares.



## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 ANIMAIS

Juvenis de *Macrobrachium olfersi* foram coletados nos meses de temperatura mais elevadas no período de 2013 a 2015, nas margens da Lagoa do Peri/SC, transportados em aquários portáteis ao LRDA e mantidos em aquário de 60 litros com água de clorada, cascalhos e abrigos. A aclimação dos juvenis foi realizada com aeração constante da água, temperatura de 24°C ( $\pm 1$ ), alimentação diária com ração comercial (Alcon Bottom Fish®) e condições naturais de fotoperíodo por 14 dias. Os juvenis foram caracterizados pelo comprimento total inferior a 21 mm (Ammar et al. 2001). O LRDA possui a autorização do IBAMA licença nº 15294/1 para a realização das coletas para a captura de *M. olfersi* e os procedimentos realizados foram aprovados no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) vinculados ao projeto de pesquisa protocolado sob o número 2010.0029.

### 3.2 TRATAMENTO

#### 3.2.1 Procedimento de irradiação

Para os procedimentos da irradiação foi utilizado aquário escuro para a radiação não dissipar, desprovido de substratos, sob o qual foi suspensa a lâmpada UV-B (312 nm) de 6 W (Vilber – Lourmat). A irradiância foi medida pelo radiômetro *International Light* IL 1400A posicionado no fundo do aquário e foi obtido o valor de 310 mW/cm<sup>2</sup> de UV-B, com contaminação de 0,217 mW/cm<sup>2</sup> de UV-A (Nazari, 2010). Os juvenis apresentando comprimento total entre 15 e 20 mm foram empregados nos seguintes grupos experimentais: Grupo 1 - juvenis expostos à radiação UV-B por 30 minutos; grupo 2 - juvenis expostos à radiação UV-B por 60 minutos; grupo 3 - juvenis não expostos à radiação UV-B, os quais foram utilizados como controle.

Após o procedimento de irradiação, tanto os juvenis do grupo irradiados, como os juvenis do grupo controle foram mantidos nas mesmas condições da aclimação, sem a alimentação comercial para atenuar a atividade digestiva do hepatopâncreas. No entanto, os juvenis tiveram acesso à alimentação natural proveniente do aquário.

Para a realização das análises morfológicas propostas no presente estudo, a dissecação dos hepatopâncreas foi realizada após três dias da

exposição ao UV-B, tempo esse essencial para a visualização das possíveis respostas estruturais. Para a dissecação do hepatopâncreas, os camarões juvenis foram submetidos à crioanestesia ( $- 20^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 3).

Nas análises morfológicas e histoquímicas foram considerados os três grupos, sendo que para as análises de imuno-histoquímica e de ultraestrutura foram considerados os grupo UV-B 30' e controle.

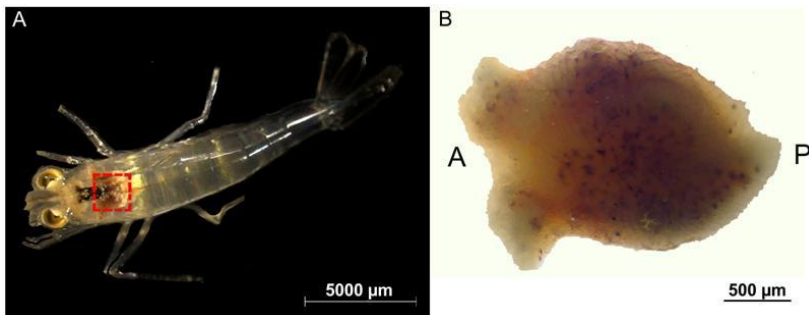


Figura 3: *Macrobrachium olfersi* juvenil e hepatopâncreas. Imagem do juvenil (A) com destaque para a localização do hepatopâncreas (quadro vermelho). Imagem do hepatopâncreas dissecado (B) em visão dorsal, sendo (A) região anterior e (P) região posterior. (Fonte: Cardoso, 2015).

### 3.3 MICROSCOPIA DE LUZ

Os hepatopâncreas foram fixados em *Bouin* alcoólico por 24h e conservados em álcool 70 %. Para a confecção dos cortes histológicos, os hepatopâncreas foram desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina e seccionados a  $6\ \mu\text{m}$ . Os cortes foram montados em lâminas tratadas com poli-L-lisina, sendo que cada lâmina continha quatro cortes dos hepatopâncreas por grupo, proporcionando as mesmas condições de tratamento para realização das diferentes técnicas. As secções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série alcoólica decrescente. A coloração hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para controle morfológico, bem como às análises morfológicas e morfométricas.

#### 3.3.1 Morfologia e morfometria

As análises morfológicas foram realizadas de acordo com Franceschini-Vicentini et al. (2009), sendo analisados: (1) posição e



formato da célula, (2) presença e localização de vacúolos, (3) localização do núcleo.

Cada tipo celular epitelial do hepatopâncreas foi quantificado por contagem direta no túbulo longitudinal do hepatopâncreas (aumento de 400 x) (Figura 4 A). As medidas ( $\mu\text{m}$ ) dos eixos longitudinal (L) e transversal (T) das células do hepatopâncreas e dos vacúolos foram mensuradas com auxílio de ocular micrométrica (Olympus) acoplada ao microscópio de luz (aumento 1000 x) em túbulos transversais. O cálculo do volume das células e dos vacúolos foi obtido através da fórmula  $(\pi.L.T^2)/6$  (Odinetz-Collart e Rabelo, 1996) (Figura 4 C).

A quantificação dos vacúolos foi realizada por meio da Graticula de Weibel ao microscópio de luz (Olympus CBA) (aumento de 400 x), a qual foi ajustada em uma única área de cada secção do hepatopâncreas (Mandarim de Lacerda, 2003) (Figura 4 B).

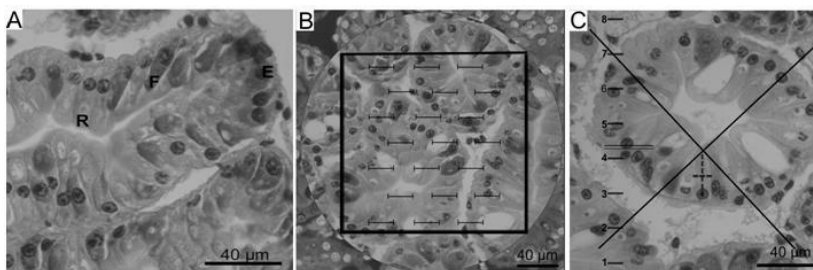


Figura 4: Biometria nas células do hepatopâncreas de *M. olfersi*. Contagem direta das células no túbulo longitudinal (A). Contagem dos vacúolos através da Graticula de Weibel (B). Medidas das células e dos vacúolos utilizando a ocular micrométrica (C). Célula E (E); célula F (F); célula R (R). As medidas e contagens celulares foram realizadas em um total de doze lâminas histológicas. Coloração HE. (Fonte: Cardoso, 2015).

### 3.3.2 Histoquímica

Para as análises histoquímicas foram realizadas as reações com (1) Azul de Toluidina (AT-O, do inglês *Toluidine Blue*) 0,5 %, pH 3,0 para observar por meio da reação metacromática os polissacarídeos ácidos, os quais reagem com o corante (Gordon e McCandless, 1973); (2) Ácido Periódico-Schiff (PAS, do inglês *Periodic Acid Schiff*) para identificar os polissacarídeos neutros (Gahan, 1984); e, (3) Sudan IV (Kay e Whitehead, 1935) para verificar o conteúdo lipídico. A análise do conteúdo lipídico pôde ser realizada no material incluído em parafina

porque muitos lipídios estão ligados às proteínas e, portanto, são resistentes à extração por solventes orgânicos (Ventrella et al. 2013).

Para as reações de PAS e AT-O, as secções foram banhadas com Ácido Periódico 1 % por 15 minutos, lavadas com água corrente por 10 minutos e, em seguida, banhadas com Reativo de Schiff por 15 minutos em ambiente escuro; após esses procedimentos, as secções foram lavadas com água corrente por 15 minutos e deixadas secar em temperatura ambiente. Em seguida, o AT-O 0,5 % (pH 3,0) foi gotejado sobre as secções e deixado agir por 15 segundos, sendo então as secções lavadas com água destilada. Para a reação com Sudan IV, os cortes foram imersos no corante durante 10 minutos e lavados com álcool 70 % e contracorados com verde de metila por um minuto. Na sequência os cortes foram lavados com álcool 70 % e água destilada. Após a secagem natural dos cortes, foram montadas com Entelan® (Merck) e lamínula. O corante verde de metila foi utilizado para o reconhecimento dos tipos celulares.

### 3.3.3 Imuno-histoquímica

As análises proteicas por imuno-histoquímica foram realizadas utilizando os anticorpos primários anti-PHH3 para identificar mitose; anti-caspase-3 ativa para identificar morte celular por apoptose; PCNA para identificar estresse celular; e Drp1 para verificar a fissão mitocondrial causada por estresse nas células do hepatopâncreas dos juvenis *M. olfersi*.

Para a localização das proteínas analisadas, as secções foram submetidas ao bloqueio da atividade das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio e metanol (1:2) por 10 minutos. Em seguida, as secções foram lavadas em tampão fosfato salino - PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) pH 7,4 e permeabilizadas em PBS + Triton 0,3 % X-100 por 20 minutos, após, foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) por 30 minutos para diminuir as ligações inespecíficas e posterior incubação com os anticorpos primários (Quadro 1). As secções permaneceram a 4°C por 12 horas, então foram lavadas em PBS + Triton 0,3 % X-100 por 30 minutos e incubadas em temperatura ambiente com os anticorpos secundários por três horas (Quadro 1). Após essas horas, as secções foram lavadas com PBS + Triton 0,1 % X-100 por 30 minutos, seguido por PBS cinco minutos. A revelação das proteínas marcadas foi realizada utilizando a solução contendo 3-3, diaminobenzidina, peróxido de hidrogênio e PBS, sendo a reação bloqueada com água destilada. As secções foram desidratadas em

álcool e xilol e as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck). Os controles negativos da técnica foram realizados seguindo o protocolo para imuno-histoquímica, exceto pela substituição dos anticorpos primários por PBS na incubação.

QUADRO 1: Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados para as técnicas de imuno-histoquímica.

Anticorpo primário	Espécie desenvolvida	Origem	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
Anti-fosfohistona H3 (policlonal, Upstate)	Coelho	Humana	1:200	Anti-coelho conjugado a peroxidase (Sigma)	1:400
Anti-PCNA (policlonal, Santa Cruz)			1:100	Anti-coelho biotilado conjugado à peroxidase (Sigma)	1:200
Anti-Drp-1 (policlonal, Santa Cruz)					
Anti-caspase-3 ativa (policlonal, Abcam)					

A aquisição das fotos foi realizada no LRDA através do microscópio de luz Nikon ECLIPSE 80i com o sistema de captura Nikon DS-Fi2 Color 5.0 megapixel acoplado e o *Software NIS-D Documentation Imaging*.

### 3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os hepatopâncreas foram dissecados, fixados em Solução *Karnovsky* (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído a 4 %, e tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por 24 horas a 4°C e, após, lavados com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M. A pós-fixação foi realizada com solução de tetróxido de ósmio a 1 % em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M por uma hora, seguida pela lavagem com tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona e infiltrados em resina Spurr. Após a polimerização da resina, os blocos foram cortados em ultramicrotomo para a obtenção de cortes semifinos (700 nm) e ultrafinos (60 - 70 nm). Os cortes semifinos foram corados com solução de azul de toluidina 1% para observação da qualidade do material e análises morfológicas das células controles e irradiadas em microscópio de luz. Os cortes ultrafinos coletados em grades de 300 mesh foram contrastados com citrato de

chumbo por 30 minutos e acetato de uranila por 5 minutos (Reynolds, 1963) e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM 1011; JEOL Ltd., Tokyo, Japão, 80 kV) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados quantitativos foram apresentados em média e erro médio padrão. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através da análise de variância ANOVA de uma-via, seguida do teste *post hoc* de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram realizadas no programa estatístico Statistica® versão 10.0 para Windows. Os resultados das técnicas de histoquímica e imuno-histoquímica foram obtidos a partir de três experimentos independentes para cada análise. Os resultados da técnica de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidos a partir de no mínimo dois indivíduos diferentes para cada análise.

## 4 RESULTADOS

O epitélio celular do hepatopâncreas dos camarões juvenis *Macrobrachium olfersi* foi caracterizado e os efeitos da radiação UV-B sobre as células desse epitélio foram analisados. Alterações morfológicas, morfométricas, histoquímicas, imuno-histoquímicas e ultraestruturais foram observadas nas células epiteliais do hepatopâncreas após a irradiação, indicando que a radiação UV-B é capaz de induzir respostas celulares e prejudicar as funções realizadas por essas células.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA E DA DINÂMICA CELULAR NO HEPATOPÂNCREAS

A análise histológica mostrou que o hepatopâncreas dos juvenis de *M. olfersi* é um órgão bilobulado constituído por uma rede de túbulos em fundo cego. Os túbulos estão circundados pelo tecido conjuntivo frouxo com poucas fibras e apresentam diferentes tipos de hemócitos (Figura 5 A - D). Células miofibrilares foram reconhecidas no tecido conjuntivo, ao longo do comprimento do túbulo, ancoradas à lâmina basal das células epiteliais.

Devido à estrutura tubular do órgão, nas secções realizadas no hepatopâncreas observam-se tanto túbulos transversais quanto longitudinais (Figura 5 B). Os túbulos do hepatopâncreas apresentaram os quatro tipos celulares básicos do epitélio dos crustáceos decápodes, as células E, células R, células F e células B, e ainda, a presença da célula M, a qual é reconhecida apenas em alguns decápodes. Estas células se apresentam organizadas e justapostas, caracterizando o epitélio cilíndrico pseudoestratificado com borda em escova (Figura 5 C). As células R são as mais abundantes nos túbulos, já as células M são as mais escassas e as únicas que não mantêm contato com a luz do túbulo, estando justapostas à lâmina basal.

Nos túbulos foram reconhecidas as zonas proximal, medial e distal, distinguidas pela presença e pelo estágio das células do epitélio (Figura 5 D e Figura 2 C). A zona distal foi caracterizada pela região final em fundo cego e pela presença principalmente das células E (Figura 6 A), além das células F e R sem a presença de vacúolos citoplasmáticos, caracterizando o perfil das células imaturas. Na zona medial foram reconhecidas as células F e R apresentando pequenos vacúolos citoplasmáticos, mostrando que as células estão iniciando as

atividades metabólicas. As células M foram ser localizadas nas três zonas do túbulo. Na zona proximal estão presentes as células F e as células R contendo vacúolos citoplasmáticos maiores, caracterizando uma célula madura. As células B estão presentes com menor frequência na zona medial, ocorrendo principalmente na zona proximal.

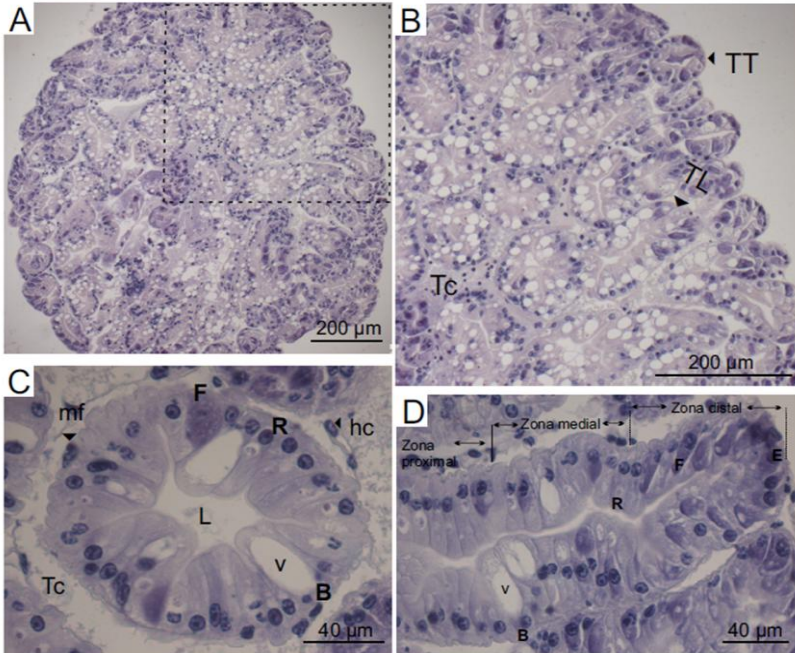


Figura 5: Secções do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. (A) vista panorâmica da secção transversal do grupo controle. (B) Aumento na secção do hepatopâncreas evidenciando túbulos transversais (TT), longitudinais (TL) e tecido conjuntivo (Tc). (C) Vista de um túbulo transversal mostrando o lúmen (L), as células R, F e B e o espaço entre os túbulos. Células miofibrilares (mf); hemócitos (hc). (D) Vista de um túbulo longitudinal, destacando as zonas distal, medial e proximal (células E, F, R, B, M); vacúolos (v). Coloração HE.

As células que compõem o epitélio pseudoestratificado cilíndrico do hepatopâncreas apresentam características como formato, posição nuclear e presença de vacúolos, que as distinguem. Estas características celulares estão demonstradas no Quadro 2.

QUADRO 3: Características das células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi* controle e irradiado.

Tipo celular	Borda em escova	Forma celular	Posição nuclear	Vacúolo	Afinidade tintorial
E	Ausente	Cúbica	Central	Ausente	Basofílica
F	Presente	Cilíndrica	Basal	Presente	
R					Acidofílica
B					
M	Ausente	Cilíndrica	Central		Basofílica

Na célula M foi possível observar a presença de um único vacúolo, característico de quando a célula armazena substâncias proteicas (Figura 6 B, C). Observou-se que as células R podem apresentar vacúolos citoplasmáticos supranucleares de diferentes tamanhos, dependendo da sua posição no túbulo. À medida que as células epiteliais proliferam, as células R e deslocam-se em direção à zona proximal, onde apresentam vacúolos maiores e também onde degeneram ao final das suas atividades metabólicas (Figuras 6 D - G). Da mesma forma, as células F apresentaram pequenos vacúolos os quais coalescem conforme a célula amadurece e, também, um vacúolo apical (Figuras 7 A - D). As células B apresentaram vacúolos que coalescem em um grande vacúolo supranuclear, ocupando a maior parte do citoplasma e fazendo com que a célula adquira formato globular e núcleo basal periférico. Além desse grande vacúolo, as células B também apresentaram pequenas vesículas apicais. Durante a maturação, o vacúolo é eliminado para o lúmen do túbulo (Figuras 7 E - H).

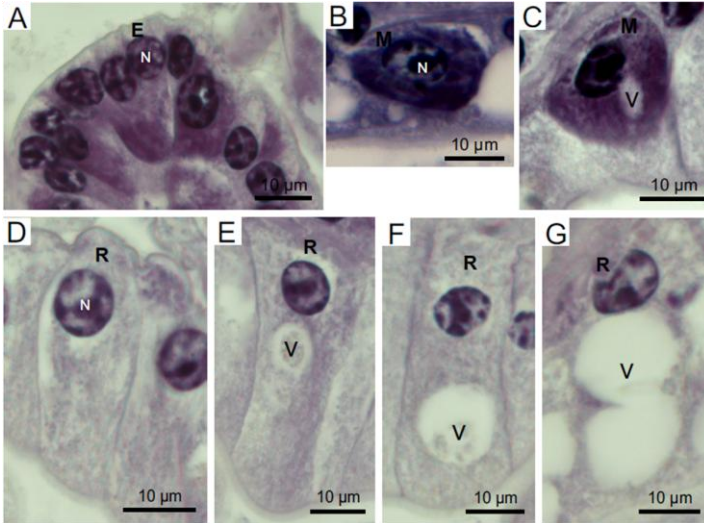


Figura 6: Caracterização dos tipos das células do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Células epiteliais do grupo controle, (A) Células E; (B, C) Célula M; (D - G) Célula R. Núcleo (N); vacúolo (v). Coloração HE.

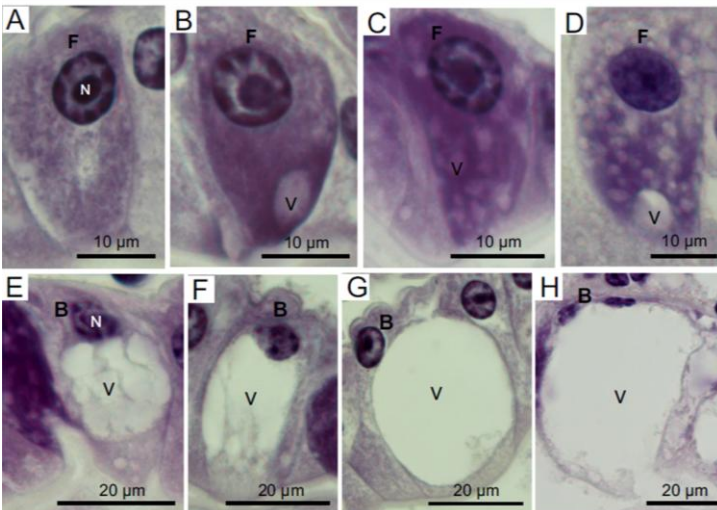


Figura 7: Caracterização dos tipos das células do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Células epiteliais do grupo controle, (A - D) Células F; (E - H) Célula B. Núcleo (N); vacúolo (v). Coloração HE.



As análises morfológicas demonstraram alterações na organização justaposta das células epiteliais e na homogeneidade do citoplasma dos grupos irradiados com UV-B em comparação com o grupo controle (Figura 8 A - F). Nas análises morfométricas observou-se que as células B do grupo UV-B 60' apresentaram maior frequência e aumento do volume celular em comparação com o grupo controle (Figura 9 A, B). No entanto, não se observou alterações na posição das células nos túbulos do hepatopâncreas quando se comparou os grupos controle e irradiados com UV-B. Ocorreu aumento no número de vacúolos nas células R e B dos grupos UV-B 30' e UV-B 60' quando comparados com o grupo controle (Figura 9 C). O grupo UV-B 60' também apresentou aumento no volume vacuolar das células R e B em comparação ao grupo controle (Figura 9 D).

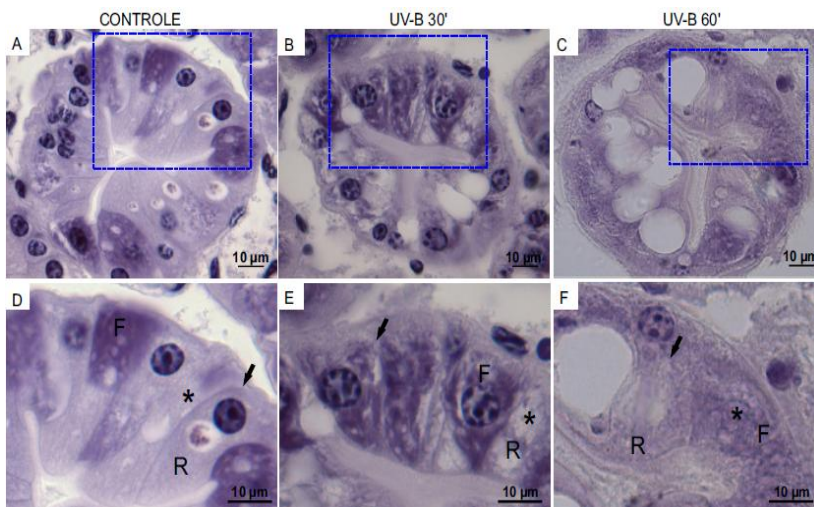


Figura 8: Alterações observadas nas células epiteliais do túbulo do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi* na zona medial, após a radiação com UV-B. Seção transversal do túbulo controle (A, D) apresentando, no aumento em (D), citoplasma homogêneo (asterisco) e organização celular e limites celulares (seta) claramente distinguíveis, diferente nos grupos irradiados com UV-B 30' (B, E) e UV-B 60' (C, F). Célula R (R); célula F (F). Coloração HE.

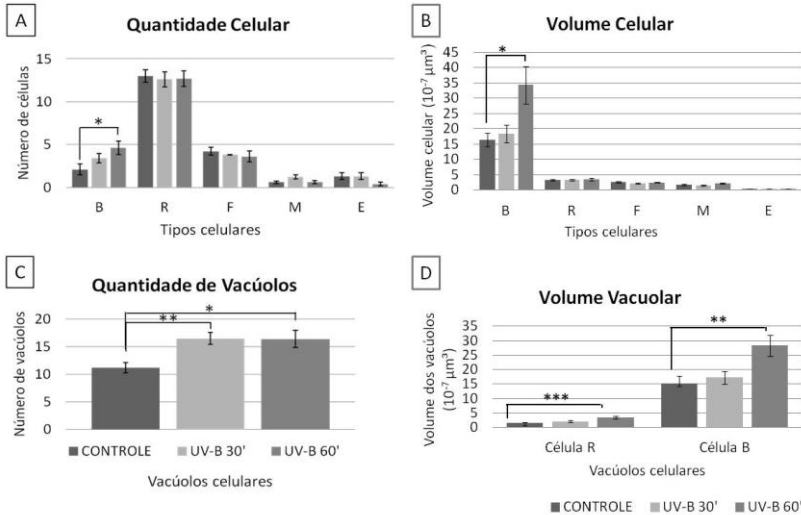


Figura 9: Morfometria das células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. (A) Quantidade dos tipos celulares no túbulo dos hepatopâncreas dos grupos controle e irradiados com UV-B. (B) Volume das células dos grupos controle e irradiados com UV-B. (C) Número de vacúolos por área das células R e B nos grupos controle e irradiados UV-B. (D) Volume dos vacúolos das células R e B nos grupos controle e irradiados com UV-B. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão e diferença significativa de  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2 ANÁLISES DOS POLISSACARÍDEOS E LIPÍDIOS NO EPITÉLIO TUBULAR DO HEPATOPÂNCREAS

O hepatopâncreas de *M. olfersi* apresentou reação positiva para polissacarídeos neutros, polissacarídeos ácidos (Figura 10 A - I) e lipídios.

As células epiteliais do hepatopâncreas do grupo controle apresentaram reação positiva para polissacarídeos ácidos no citoplasma das células F, M e em menor intensidade nas células E e nos núcleos celulares. As células R e B apresentaram reação positiva principalmente para polissacarídeos neutros, os quais também reagiram nos vacúolos celulares, nas microvilosidades e na lâmina basal (Figura 10 A, D, G).

As células R e B do grupo UV-B 30' apresentaram aumento na reação positiva para polissacarídeos neutros quando comparados com o grupo controle (Figura 10 B, E, H). Já as células R e B do grupo UV-B 60' apresentaram intensa reação positiva para polissacarídeos ácidos,

quando comparados com o grupo controle. No grupo UV-B 60' também foi observado aumento na reação positiva para polissacarídeos neutros nas microvilosidades e pequenos grânulos nos vacúolos, nas microvilosidades e nas células (Figura 10 C, F, I).

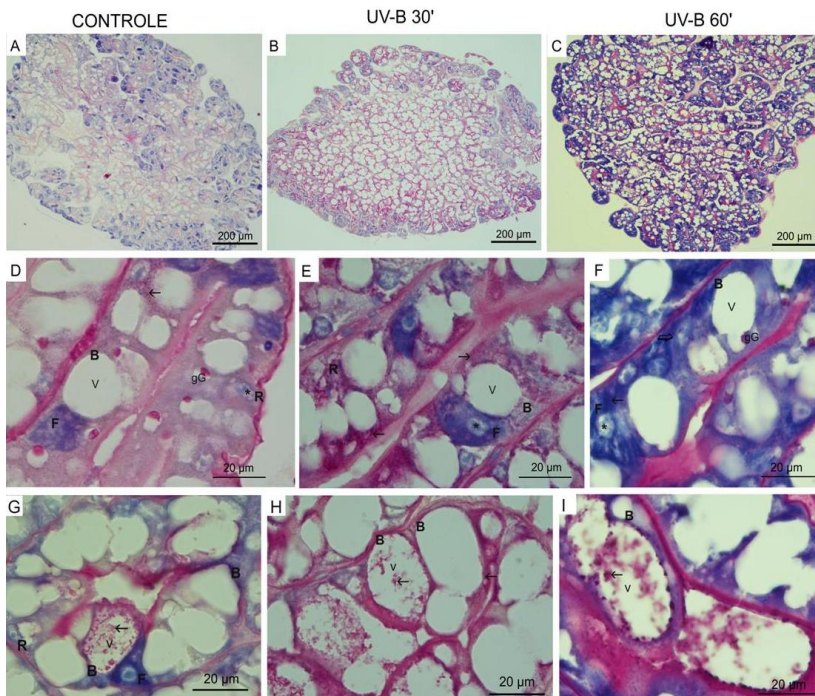


Figura 10: Efeito da radiação UV-B na produção dos polissacarídeos ácidos e neutros nos hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Vista panorâmica das secções longitudinais dos hepatopâncreas dos grupos: controle (A) e irradiados UV-B 30' (B) e UV-B 60' (C). As setas destacam a presença de polissacarídeos neutros nos grupos controle (D, G), UV-B 30' (E, H) e UV-B 60' (F, I). As setas vazadas destacam a presença de polissacarídeos ácidos nos grupos controle (D, G), UV-B 30' (E, H) e UV-B 60' (F, I). Os asteriscos sinalizam os núcleos apresentando reação positiva para polissacarídeos ácidos. Células R (R); célula F (F); célula B (B); grânulos de glicogênio (gG); vacúolos (v). Coloração PAS e AT-O. Foi analisado o total de três lâminas, em experimentos independentes.

O perfil das reações para PAS+AT-O no hepatopâncreas foi observado também através da análise da Densidade Integrada em pixels (Figura 11). A quantificação por pixels não mostrou diferença entre os grupos conforme apresentado na Figura, no entanto as imagens

apresentadas na Figura 10 evidenciam aumento na reatividade para polissacarídeos neutros e ácidos dos grupos irradiados.

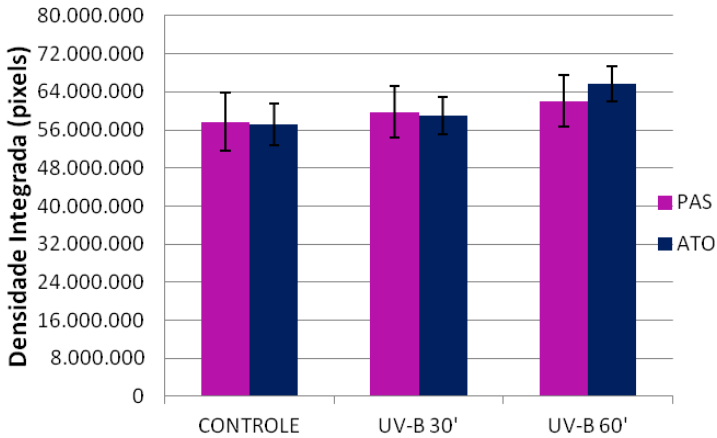


Figura 11: Densidade Integrada da reação positiva de polissacarídeos ácidos e neutros nos hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Grupos controle, UV-B 30' e UV-B 60'. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. Foi analisada a mesma área de cada secção histológica dos hepatopâncreas dos grupos controle e irradiados.

A análise histoquímica para o conteúdo lipídico nas células epiteliais do hepatopâncreas mostrou que nos grupos irradiados com UV-B houve diminuição dos lipídios quando comparados com o grupo controle (Figura 12 A - F). O citoplasma (Figura 13 A - F) e os vacúolos das células R e B (Figura 14 A - F) nos grupos irradiados apresentaram reação fraca para Sudan IV, enquanto que no grupo controle a reação foi intensa.

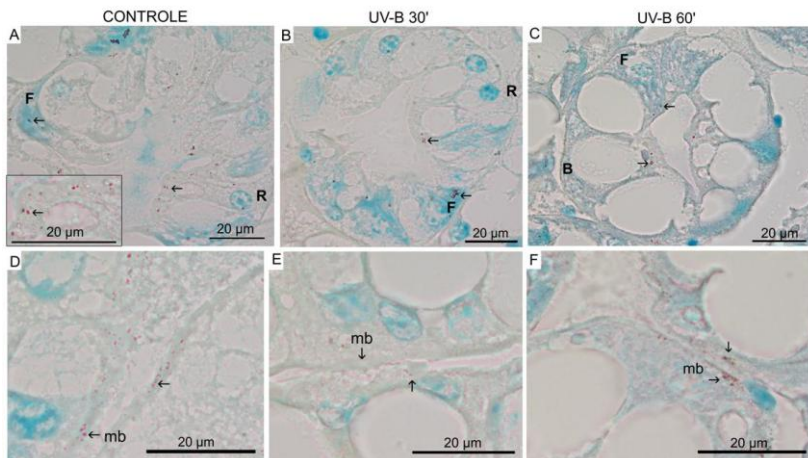


Figura 12: Efeito da radiação UV-B nos lipídios dos hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Vista dos túbulos transversais destacando a presença de lipídios no citoplasma das células (setas) epiteliais do grupo controle (A) e dos grupos irradiados UV-B 30' (B) e UV-B 60' (C). Em (A), ampliação destacando células reativas para Sudan IV (quadro). Detalhe da marcação (setas) na membrana basal (mb) no grupo controle (D) e nos grupos irradiados UV-B 30' (E) e UV-B 60' (F). Célula R (R); célula F (F); célula B (B). Coloração Sudan IV; contracoloração verde de metila. Foi analisado o total de três lâminas, em experimentos independentes.

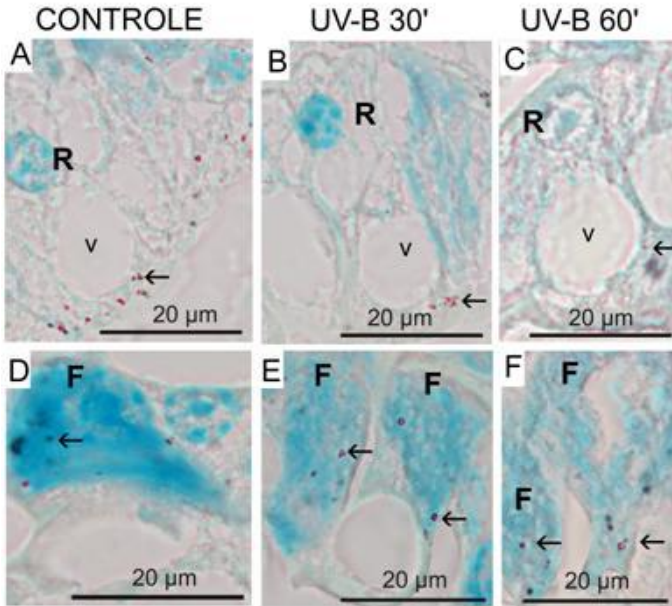


Figura 13: Detalhe das marcações lipídicas nas células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Marcações citoplasmáticas (setas) nas células R (R) do grupo controle (A) e dos grupos UV-B 30' (B) e UV-B 60' (C). Marcações citoplasmáticas (setas) nas células F (F) do grupo controle (D) e dos grupos UV-B 30' (E) e UV-B 60' (F). Coloração Sudan IV; contracoloração verde de metila. Foi analisado o total de três lâminas, em experimentos independentes.

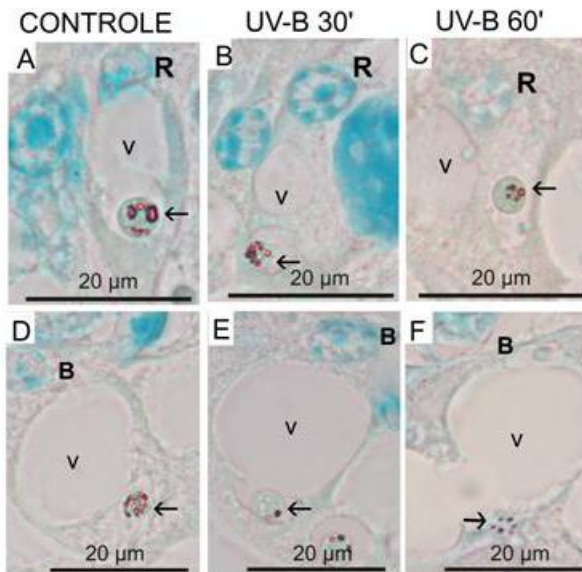


Figura 14: Detalhe das marcações lipídicas nos vacúolos das células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Marcações nos vacúolos (setas) das células R (R) do grupo controle (A) e dos grupos UV-B 30' (B) e UV-B 60' (C). Marcações nos vacúolos (setas) das células B (B) do grupo controle (D) e dos grupos UV-B 30' (E) e UV-B 60' (F). Coloração Sudan IV; contracoloração verde de metila. Foi analisado o total de três lâminas, em experimentos independentes.

#### 4.3 PERFIL DE PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE DAS CÉLULAS EPITELIAIS DO HEPATOPÂNCREAS

A atividade de proliferação das células E foi observada nas zonas distal, medial e proximal dos túbulos do hepatopâncreas, nos grupos controle e irradiado. Foi possível reconhecer núcleos mitóticos em diferentes estágios da divisão celular (Figura 15 A - C). Este resultado foi confirmando por meio da análise da proteína PHH3 por imunohistoquímica (Figura 15 D - F). Nos túbulos do grupo controle foram identificados núcleos de proliferação principalmente na zona distal, com menor frequência nas zonas medial e proximal (Figura 16). No grupo irradiado houve redução da proliferação na zona distal e aumento da proliferação celular principalmente na zona proximal.

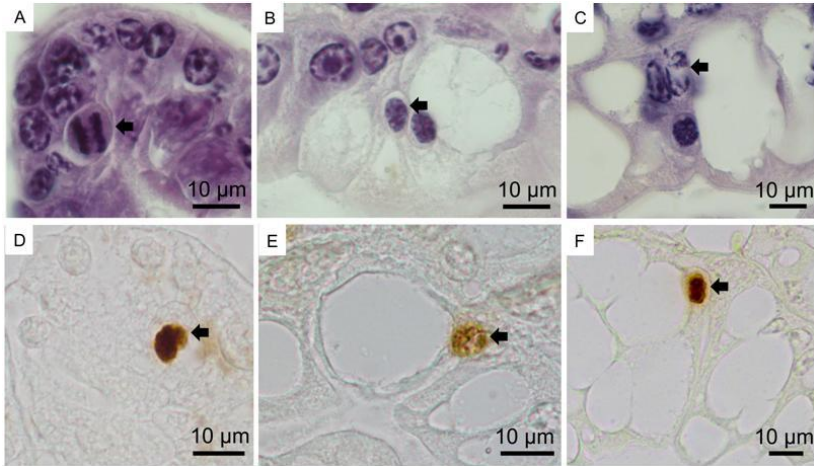


Figura 15: Secções do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi* mostrando células E em proliferação. (A, D) Célula em mitose (seta) na zona distal; (B, E) Célula em mitose (seta) na zona medial, no grupo controle. (C, F) Célula em mitose (seta) na zona proximal, no grupo irradiado. Para imuno-histoquímica, foi analisada o total de três lâminas, em experimentos independentes. (A, B, C: Coloração HE; D, E, F: Imuno-histoquímica para PHH3).

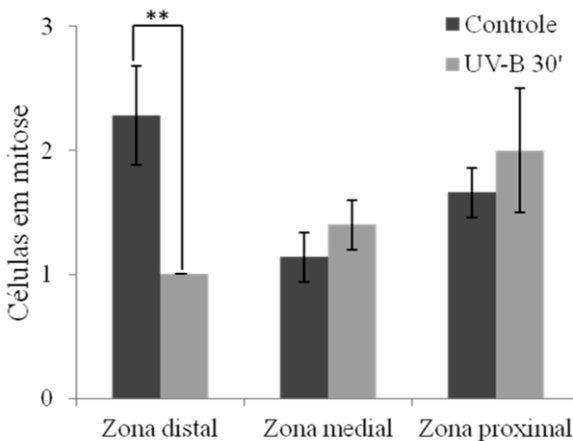


Figura 16: Média das células E em mitose nas zonas distal, medial e proximal do túbulo do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi* dos grupos controle e irradiado, obtido pela imunolocalização da proteína PHH3. Os dados foram obtidos por contagem direta em seis lâminas histológicas, expressos em média  $\pm$  erro padrão e diferença significativa de  $p \leq 0,05$ .



As células epiteliais do hepatopâncreas irradiados com UV-B 30' apresentaram intensa atividade da proteína caspase-3, relacionada diretamente com morte celular por apoptose, quando comparada com as marcações das células do hepatopâncreas do grupo controle (Figura 17 A - D). As marcações foram citoplasmáticas e a imunolocalização revelou maior presença da caspase-3 na zona proximal do túbulo no grupo irradiado (Figura 17 A, B). Já o grupo controle apresentou marcação principalmente nas zonas medial e proximal do túbulo (Figura 17 C, D).

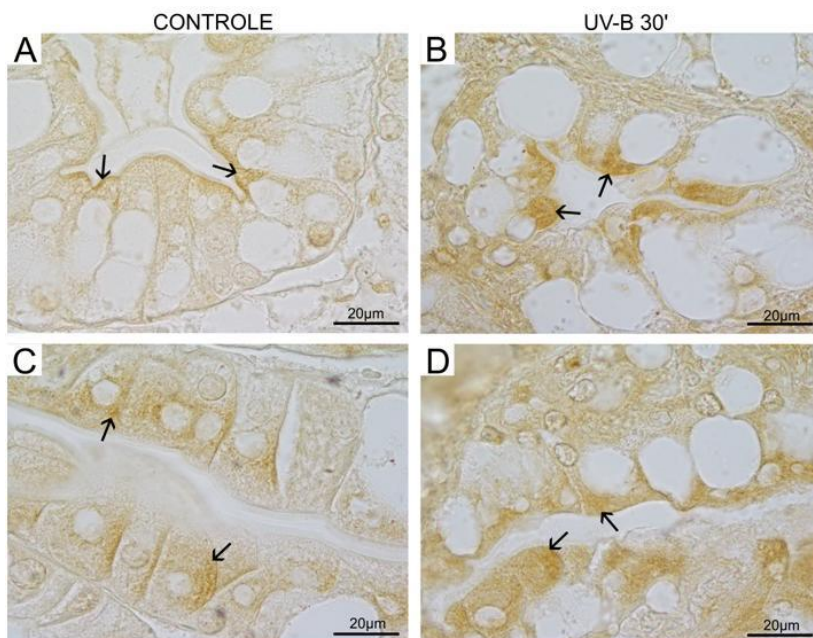


Figura 17: Imuno-histoquímica para morte celular por apoptose no hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. (A, B) Zona proximal do túbulo do hepatopâncreas em vista transversal e (C, D) zona medial em vista longitudinal. Marcações para caspase 3 (seta) nos juvenis controles (A, C) e nos juvenis irradiados com UV-B 30' (B, D).

#### 4.4 ANÁLISES DAS PROTEÍNAS DE ESTRESSE CELULAR INDUZIDAS PELA RADIAÇÃO UV-B

As mitocôndrias das células epiteliais R e F do hepatopâncreas irradiados com UV-B 30' apresentaram maior atividade de fissão

mitocondrial, quando comparada com as células epiteliais do hepatopâncreas não irradiado (Figura 18 A - E). As marcações foram identificadas por meio da imunolocalização da proteína Drp1, relacionada com o estresse celular. As marcações ocorreram no citoplasma, principalmente na região apical da célula e ao redor do núcleo.

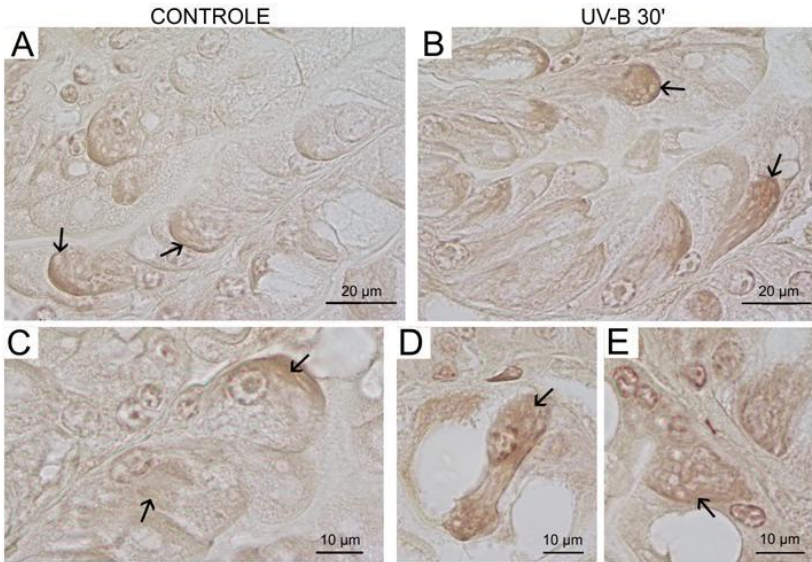


Figura 18: Fissão mitocondrial nas células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. (A, C) Grupo controle e (B, D, E) grupo UV-B 30' apresentando a imunolocalização da proteína Drp1.

As células epiteliais do hepatopâncreas irradiadas com UV-B 30' apresentaram intensa atividade da proteína PCNA, quando comparada com as marcações das células epiteliais do hepatopâncreas do grupo controle. As marcações foram citoplasmáticas, na região apical da célula, local onde PCNA desempenha funções de recuperação celular ocasionado por estresse (Figura 19 A - D).

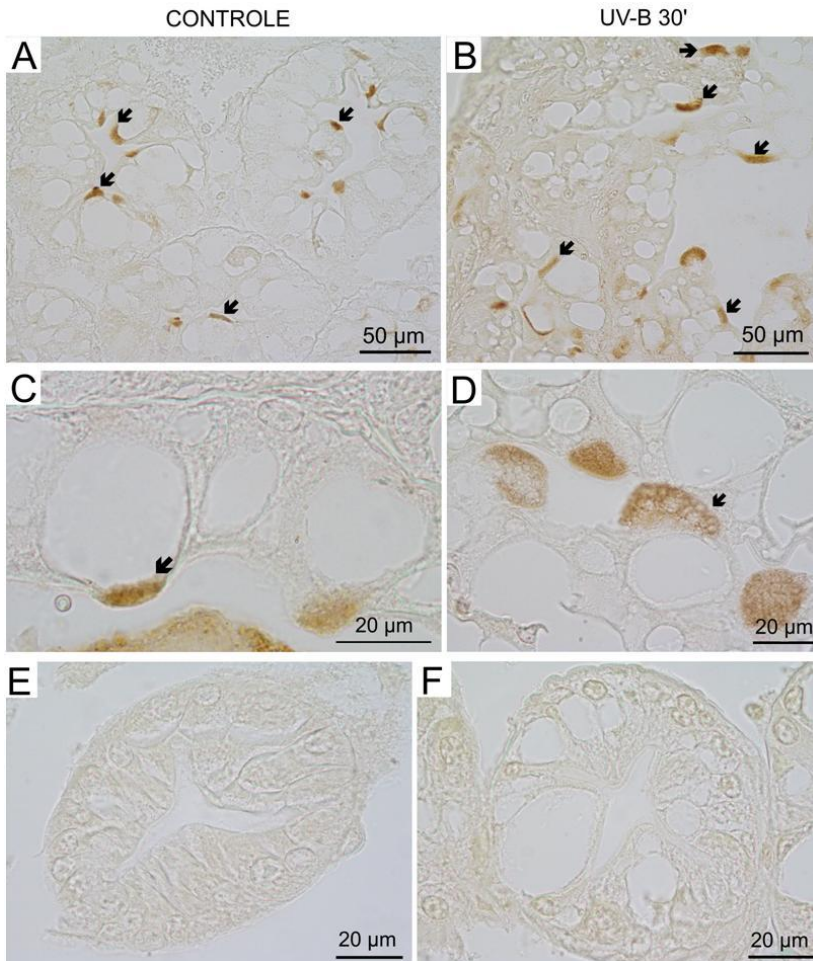


Figura 19: Imuno-histoquímica para PCNA no hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Secção do hepatopâncreas dos grupos controle (A, C) e irradiados UV-B 30' (B, D), apresentando marcações para PCNA (seta). Controle negativo da técnica de imuno-histoquímica para células epiteliais do hepatopâncreas de juvenis controle (E) e irradiado com UV-B 30' (F).

#### 4.4 ANÁLISES DAS MEMBRANAS E ORGANELAS CELULARES

Os diferentes tipos celulares epiteliais presentes nos túbulos do hepatopâncreas foram identificados nos cortes semifinos (700 nm) do grupo controle e irradiado (Figura 20 A - F). Foram reconhecidas as

zonas distal, medial e proximal dos túbulos do hepatopâncreas para as análises de ultraestrutura foram localizadas. As células F também apresentaram caráter basofílico quando coradas com azul de toluidina, diferente das células R e B e foi possível observar os vacúolos das células R e B contendo diferentes materiais no seu interior, incluindo grânulos de lipídios.

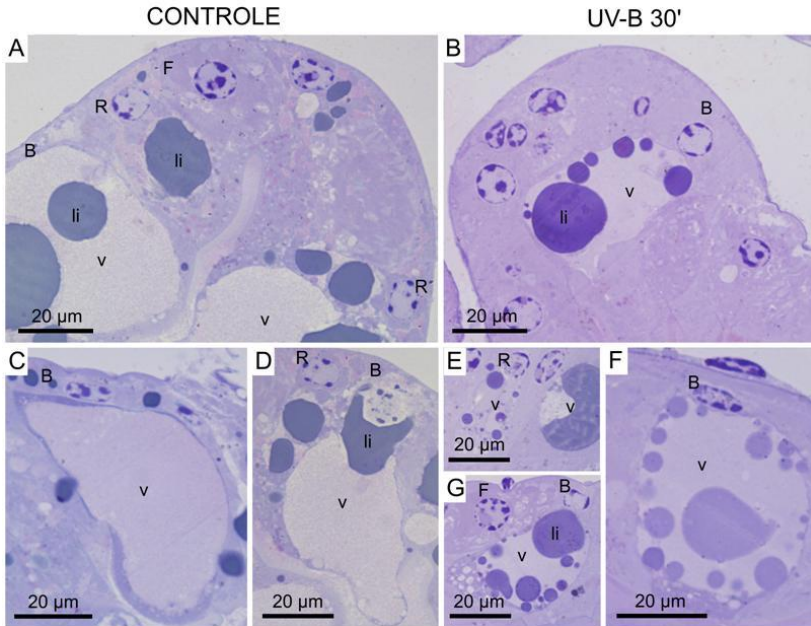


Figura 20: Cortes semifinos dos hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Células F apresentando citoplasma basofílico no controle (A) e irradiado (G). Vacúolos (v) nas células R controle (A) e irradiado (E) e nas células B controle (A, C, D) e irradiado (B, F, G), mostrando a presença de lipídios (li). Coloração com azul de toluidina.

#### 4.5.1 Descrição das células R, F e B do grupo controle e irradiado

Foi possível observar através da análise ultraestrutural a morfologia das células R e F e a característica do epitélio com células justapostas. As células R do grupo controle apresentaram o núcleo localizado na porção basal, com formato arredondado, vacúolo supranuclear e microvilosidades na porção apical (Figura 21 A). As

células F do grupo controle apresentaram núcleo localizado na porção basal e com formato arredondado (Figura 21 B).

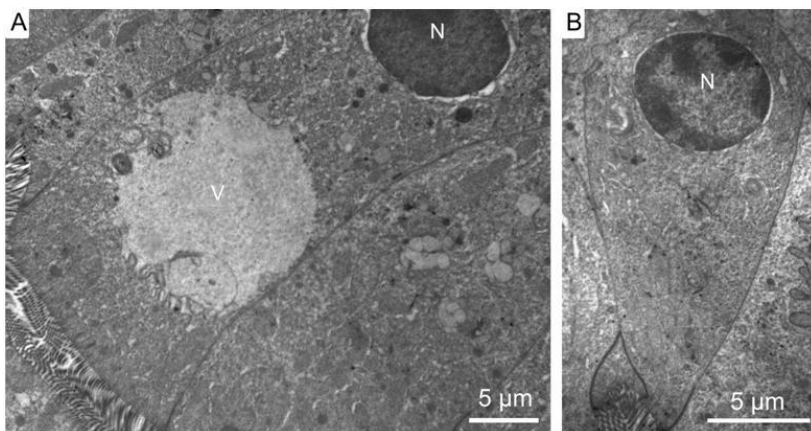


Figura 21: Ultraestrutura das células R e F do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*, grupo controle. (A) Célula R, mostrando o núcleo (N), vacúolo (v). (B) Célula F, mostrando o núcleo.

O RER nas células F do grupo controle está localizado próximo ao núcleo e disperso por grande parte do citoplasma (Figura 22 A). O RER envolve as mitocôndrias e estão associados com o complexo de Golgi. O RER apresentou um sistema de membranas muito bem desenvolvido e é possível observar a presença dos ribossomos associados à superfície citoplasmática. Suas cisternas estão dispostas de forma ampla e paralelas entre si. No grupo irradiado, o RER dessas células apresentaram dilatações entre as cisternas e menor frequência de ribossomos associados (Figura 22 B). O complexo de Golgi apresentou organização regular dos sacos lamelares, com dilatações nas suas extremidades formando grandes vesículas no grupo controle (Figura 22 C). No grupo irradiado, o complexo de Golgi apresentou organização irregular dos sacos lamelares (Figura 22 D). As mitocôndrias estão dispersas no citoplasma, apresentando formato arredondado e alongado, com cristas bem desenvolvidas e distribuídas regularmente no seu interior (Figura 22 E). Já nas células F do grupo irradiado as mitocôndrias apresentaram diminuição das cristas e perfil compatível ao processo de fissão mitocondrial (Figura 22 F). O REL não foi observado nessas células. O citoplasma das células F é eletrodense devido à presença de inúmeros polirribossomos. No grupo irradiado, observaram-se componentes autofágicos no citoplasma das células F (Figura 23 A -

C). Na região apical, próximo aos microvilos, ocorrem vesículas de secreção, no grupo controle as microvilosidades apresentaram padrão regular (Figura 23 D), no entanto no grupo irradiado, as microvilosidades apresentaram-se alteradas (Figura 23 E).

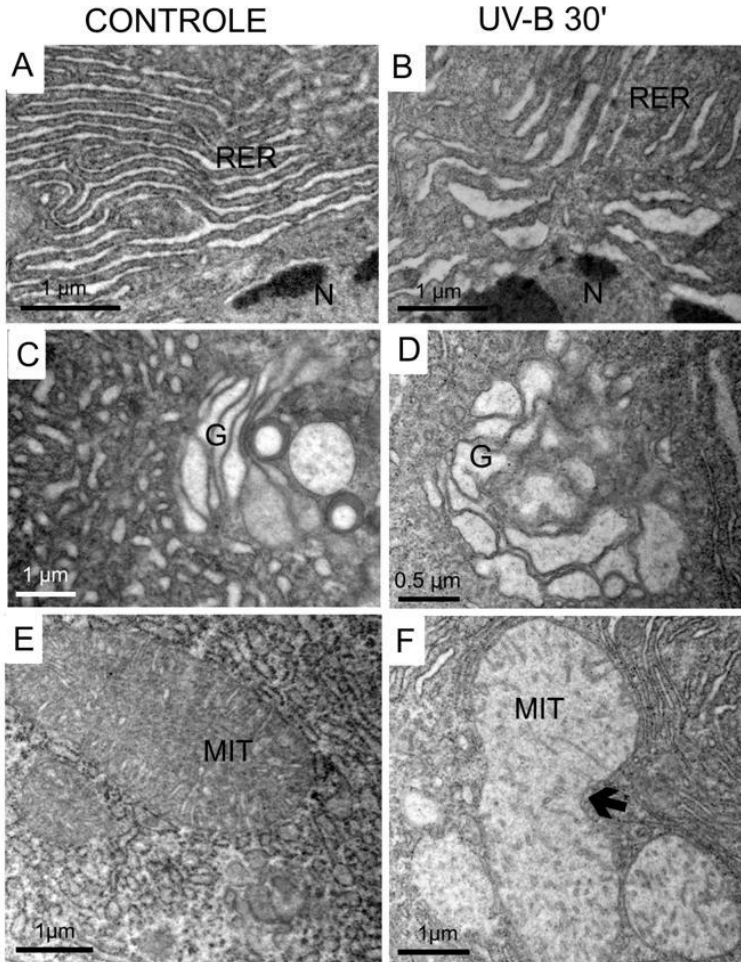


Figura 22: Secções ultrafinas das células F do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Grupo controle (A, C, E) e grupo UV-B 30' (B, D, F). (A, B) detalhe do retículo endoplasmático rugoso (RER); Núcleo (N); (C, D) detalhe do complexo de Golgi (G); (E, F) detalhe da mitocôndria (MIT); em (F), seta indica fissão mitocondrial.

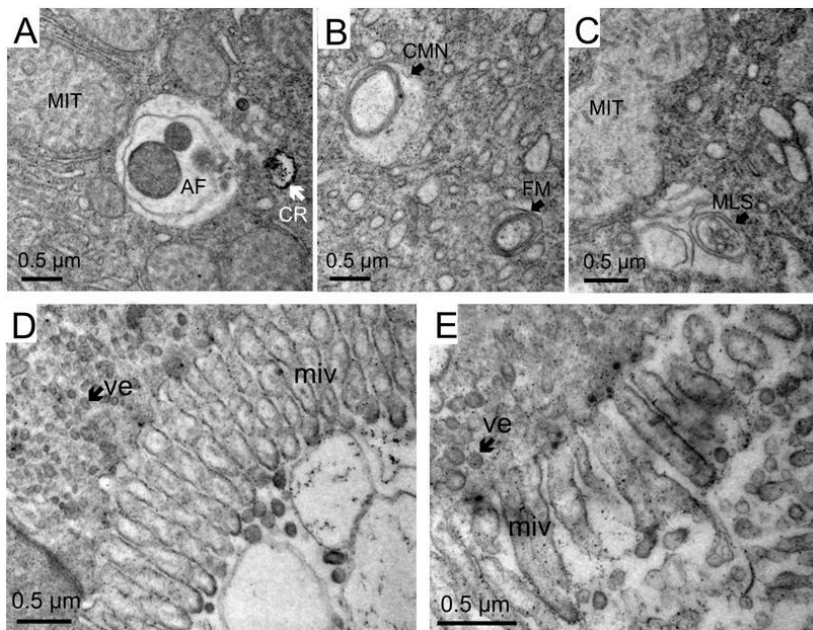


Figura 23: Alterações citoplasmáticas das células F do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. (A) Autofagossomos (AF) e corpos residuais eletrodensos (CR); alterações das membranas no grupo irradiado com UV-B 30' em (B) corpos mielinóides (CMN) e figuras mielinicas (FM), e em (C) mielinossomos (MLS). Detalhe dos microvilos na região apical da célula do grupo controle (D) e irradiado (E). Vesículas (ve); microvilosidades (miv); mitocôndria (MIT).

As células R do grupo controle e irradiado apresentaram núcleo com eucromatina e heterocromatina bem distribuída e dois nucléolos (Figura 24 A, B). O REL formou um sistema de membranas localizado na região basal da célula (Figura 24 C), mas no grupo irradiado, esse sistema foi desorganizado (Figura 24 D). Nessa região também estava localizado o Golgi (Figura 24 E), o qual apresentou organização regular dos sacos lamelares, com pequenas dilatações nas suas extremidades. No grupo irradiado, o Golgi apresentou organização irregular dos sacos lamelares (Figura 24 F). O RER das células R do grupo controle estava localizado próximo ao núcleo, envolvendo as mitocôndrias e as suas cisternas estavam dispostas de forma ampla, paralelas entre si, onde se observou a presença dos ribossomos associados à superfície citoplasmática. As mitocôndrias foram encontradas em abundância, principalmente na região apical e apresentaram formato arredondado,

com cristas bem desenvolvidas e distribuídas regularmente no seu interior (Figura 24 G). No RER das células irradiadas observaram-se dilatações entre as cisternas (Figura 24 H). As microvilosidades das células R no grupo controle apresentaram padrão regular (Figura 25 A, C), porém nos irradiados as microvilosidades apresentaram alterações (Figura 25 B, D). No citoplasma das células R do grupo controle foram observadas gotículas de lipídios e vacúolos supranucleares, os quais podem apresentar estruturas multimembranas no seu interior (Figura 25 E). No citoplasma das células R irradiadas, os vacúolos supranucleares estavam formados por multimembranas (Figura 25 F) e, ainda, foram verificados no citoplasma, componentes autofágicos e possivelmente autolisossomos (Figura 26 A - D). As mitocôndrias do grupo irradiado apresentaram diminuição das cristas (Figura 26 E - G) e formas variadas, incluindo mitocôndrias-cálice, perfil compatível ao processo de fissão mitocondrial e mitocôndrias-esféricas (Figura 26 H).

As alterações observadas nas células R e F após a irradiação estão descritas no Quadro 3.



Quadro 3: Descrição das alterações ultraestruturais encontradas nas células R e F após a irradiação com UV-B 30'.

Alterações após a irradiação com UV-B 30'		
	Célula R	Célula F
CITOPLASMA	Possíveis autolisossomos, corpos residuais eletrodensos. Alterações nas membranas celulares: vacúolos multimembranosos, corpos multivesiculados claros, figuras mielínicas, e, mielinossomos.	Corpos residuais eletrodensos, autofagossomos. Alterações nas membranas celulares: figuras mielínicas, mielinossomos, e, corpos mielínoides.
RER	Mudança na sua organização, com dilatações entre as cisternas, diminuição de ribossomos aderidos.	Desorganização do sistema de membranas, com grandes dilatações entre as cisternas.
REL	Desorganização do sistema de membranas, presença de vesículas entre as membranas.	Não observado.
Complexo de Golgi	Organização irregular dos sacos lamelares, com grandes vesículas na face cis.	Organização irregular dos sacos lamelares, com dilatações entre suas cisternas.
Mitocôndria	Formato variado, mitocôndrias-esféricas, mitocôndrias-cálice, perfil compatível ao processo de fissão mitocondrial; rompimento das membranas mitocondriais externas; diminuição/ausência das cristas mitocondriais, lise mitocondrial.	Formato variado, perfil compatível ao processo de fissão mitocondrial; diminuição das cristas mitocondriais.
MICROVILOSIDADE	Morfologia alterada; dilatações na sua extensão.	Morfologia alterada; dilatações e rompimento na sua extensão; aumento da secreção.

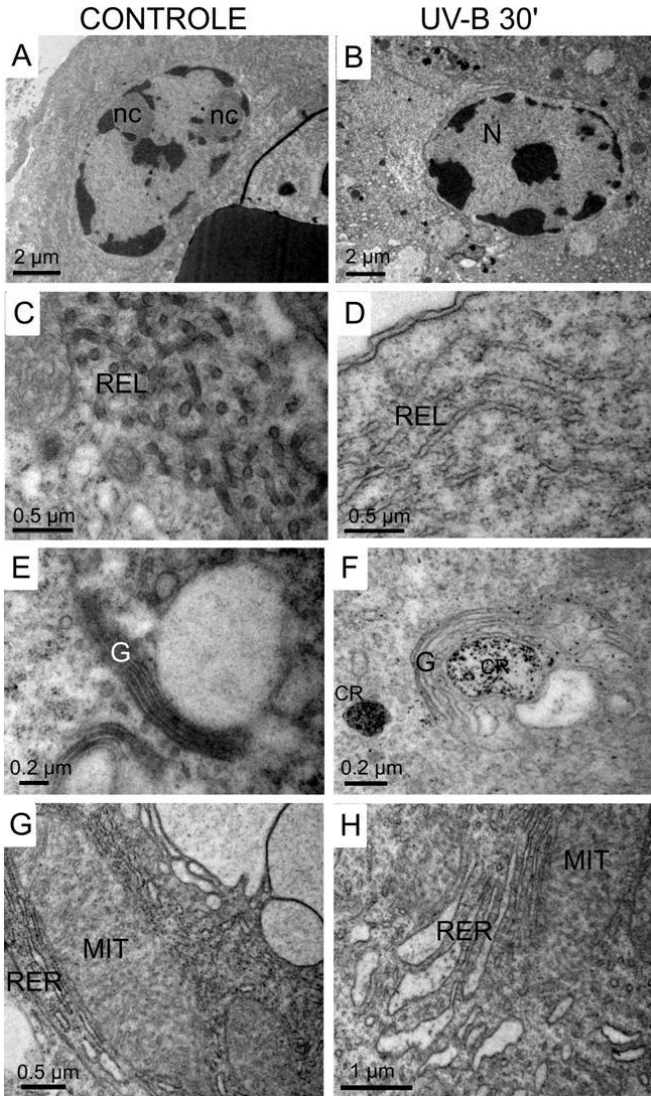


Figura 24: Secções ultrafinas das células R do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Grupo controle (A, C, E, G) e grupo UV-B 30' (B, D, F, H). (A, B) Núcleo (N) na região celular basal; (C, D) detalhe do retículo endoplasmático liso (REL); (E, F) detalhe do complexo de Golgi (G); (G, H) detalhe do retículo endoplasmático rugoso (RER) ao redor da mitocôndria (MIT). Nucléolo (nc); corpos residuais eletrodensos (CR).

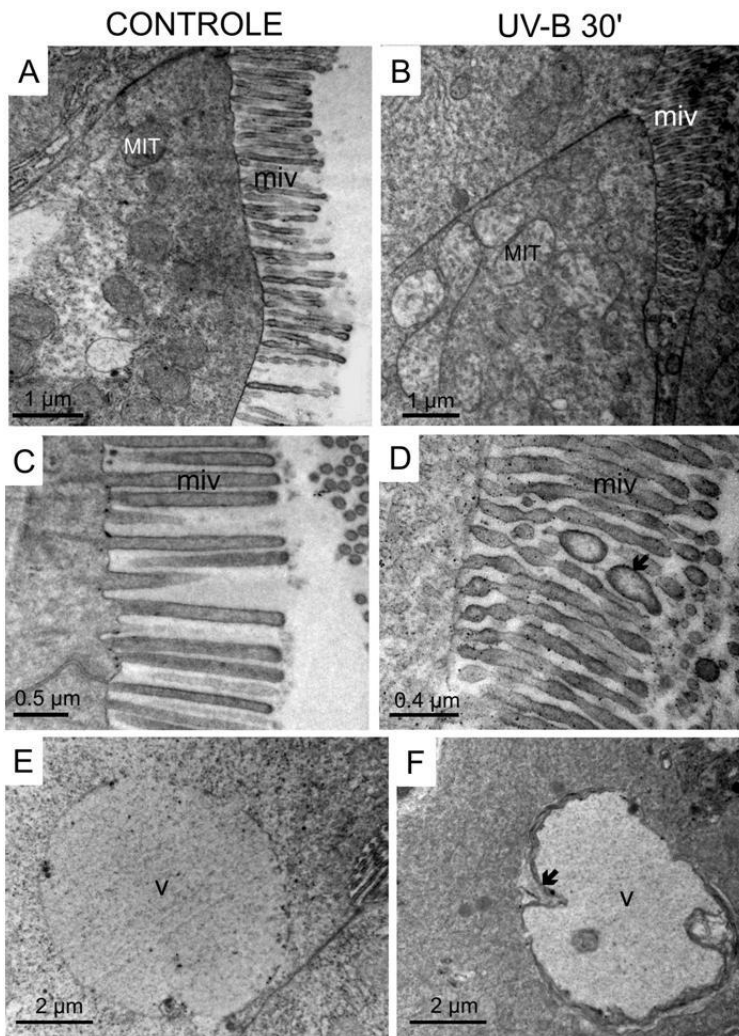


Figura 25: Secções ultrafinas das células R do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Grupo controle (A, C, E) e grupo UV-B 30' (B, D, F). (A, B) detalhe da região celular apical; (C, D) detalhe das microvilosidades (miv); seta indica alteração. (E, F) detalhe do vacúolo (v), sendo que a seta indica as multimembranas que formam o vacúolo. Mitocôndria (MIT).

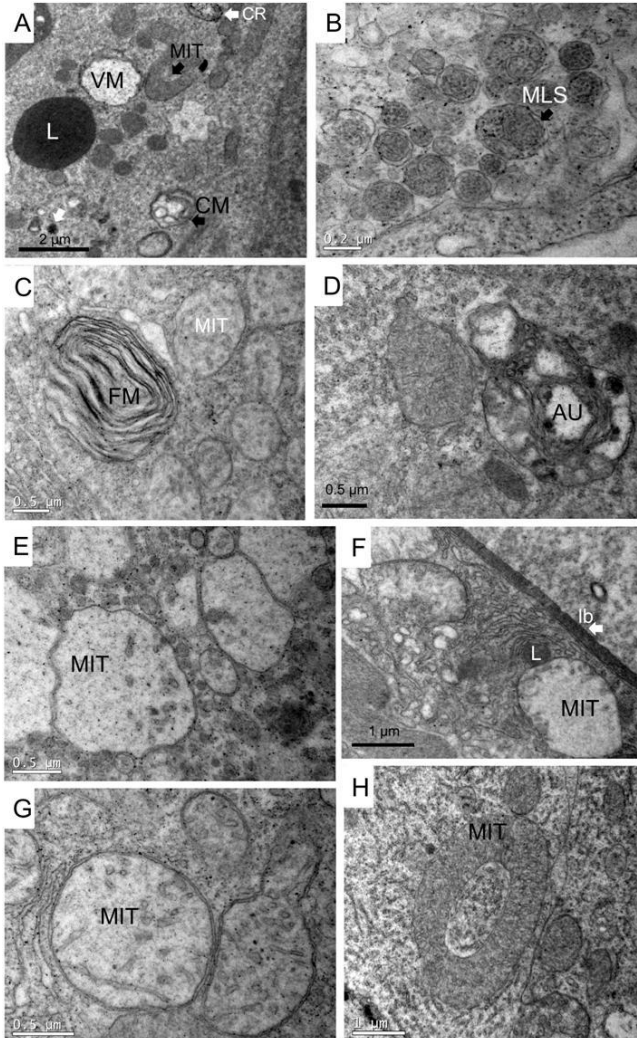


Figura 26: Secções ultrafinas das células R das hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. Grupo UV-B 30'. (A) visão geral do citoplasma apresentando mitocôndria cálice (MIT); lisossomo (L) com corpos densos; e corpos residuais eletrodensos (CR); Alterações nas membranas celulares: vacúolos multimembranares (VM); corpos multivesiculares claros (CM); em (B) mielinossomos (MLS); em (C) figuras mielínicas (FM); (D) vacúolo semelhante aos autolisossomos (AU); (E, F) lise mitocondrial; (G) mitocôndria rompida e com perda das cristas; (H) mitocôndria em forma de rosquinha. Lâmina basal (lb).

As células B apresentaram o núcleo localizado na região basal, com formato achatado e a eucromatina e heterocromatina bem distribuídas (Figura 27 A). As mitocôndrias estavam dispersas no citoplasma, apresentando formato arredondado e alongado, com cristas bem desenvolvidas e distribuídas regularmente no seu interior (Figura 27 B). O RER estava localizado na região basal da célula, próximo ao núcleo e suas cisternas dispostas paralelamente entre si, onde se observou a presença dos ribossomos associados à superfície citoplasmática (Figura 27 C). O REL não foi observado. O complexo de Golgi apresentou organização regular dos sacos lamelares, com dilatações nas suas extremidades formando grandes vesículas (Figura 27 D). No citoplasma das células B foram observadas muitas vesículas na região apical, assim como pequenos vacúolos e gotículas de lipídeos. Na região central da célula, ocorreu um grande vacúolo, o qual ocupou grande parte do citoplasma. As microvilosidades localizadas na região apical da célula apresentaram padrão regular e nas células maduras se observou a diminuição/perda dos microvilos (Figura 28 A). Na célula B do hepatopâncreas dos animais irradiados foi possível observar o citoplasma altamente eletrodense, com muitas vesículas na região apical, assim como pequenos vacúolos. Na região central da célula, forma um grande vacúolo com a presença de grânulos eletrodensos (Figura 28 B, C).

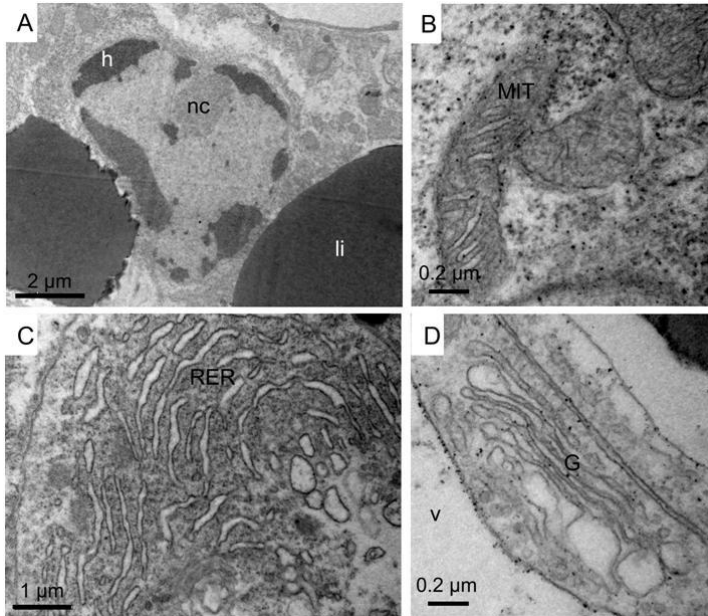


Figura 27: Ultraestrutura da célula B do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*, grupo controle. (A) detalhe do núcleo na região basal da célula; (B) mitocôndria (MIT); (C) retículo endoplasmático rugoso (RER); (D) Complexo de Golgi (G); (E) região apical da célula, mostrando vacúolos (V), vesículas (ve) e microvilosidades (miv). Grânulo de lipídio (li); heterocromatina (h); nucléolo (nc).

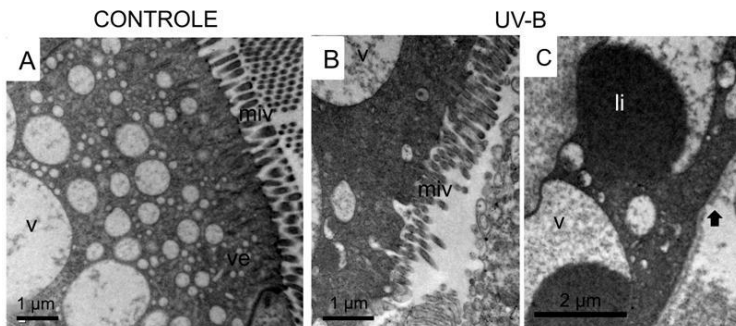


Figura 28: Ultraestrutura da célula B do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*, grupo controle e irradiado. (A) detalhe da região apical da célula do grupo controle e (B) do grupo irradiado com UV-B 30', mostrando vacúolos (V), vesículas (ve) e microvilosidades (miv). (C) Região apical da célula irradiada indicando microvilosidades degeneradas (seta). Grânulo de lipídio (li).

A lâmina basal nas células epiteliais do hepatopâncreas do grupo controle apresentou-se contínua (Figura 29 A), já no grupo irradiado, a lâmina basal apresentou regiões rompidas e com dobras (Figura 29 B, C).

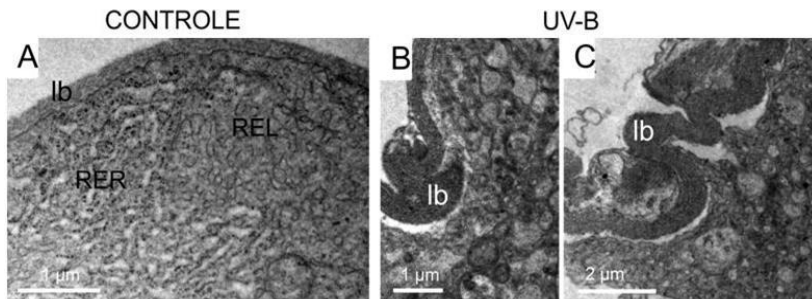


Figura 29: Secções ultrafinas do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi* mostrando o detalhe da lâmina basal (lb) no controle (A) e no irradiado (B, C). Retículo endoplasmático liso (REL); retículo endoplasmático rugoso (RER).

Quadro 4: Resumo dos resultados obtidos pelas análises no hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*.

RESULTADO DAS ANÁLISES REALIZADAS NO HEPATOPÂNCREAS		
Epitélio celular:	CONTROLE	IRRADIADO
Cinco diferentes células: Células E; R; F; B; M	Citoplasma homogêneo Padrão epitelial organizado	Citoplasma menos homogêneo Descaracterização epitelial
Presença de vacúolo celular	+	+++
Proliferação celular	Principalmente na zona distal	Principalmente na zona proximal
Morte celular	+	++
Proteínas de estresse celular	+	++
Polissacarídeos	Ácidos	+++
	Neutros	+++
Lipídios	+++	+
Células epiteliais R e F:	CONTROLE	IRRADIADO
Membrana Basal	Íntegra e contínua	Rompida e com dobras
RER	Cisternas paralelas entre si; presença dos ribossomos associados à superfície citoplasmática	Dilatações nas cisternas; diminuição dos ribossomos aderidos à superfície citoplasmática
REL	Formam um sistema de membranas nas células R	Desorganização do sistema de membranas
Complexo de Golgi	Organização regular dos sacos lamelares; dilatações vesiculares nas extremidades	Organização irregular dos sacos lamelares
Mitocôndrias	Elípticas; cristas desenvolvidas e distribuídas regularmente	Formato variado; fissão mitocondrial; rompimento das membranas externas; diminuição das cristas
Citoplasma	Grânulos de lipídios, vacúolos membranosos	Alterações de membranas celulares; componentes autofágicos
Microvilosidades	Padrão regular	Alterada com dilatações

Síglas: +: pouco presente; ++: presente; +++: abundantemente presente.



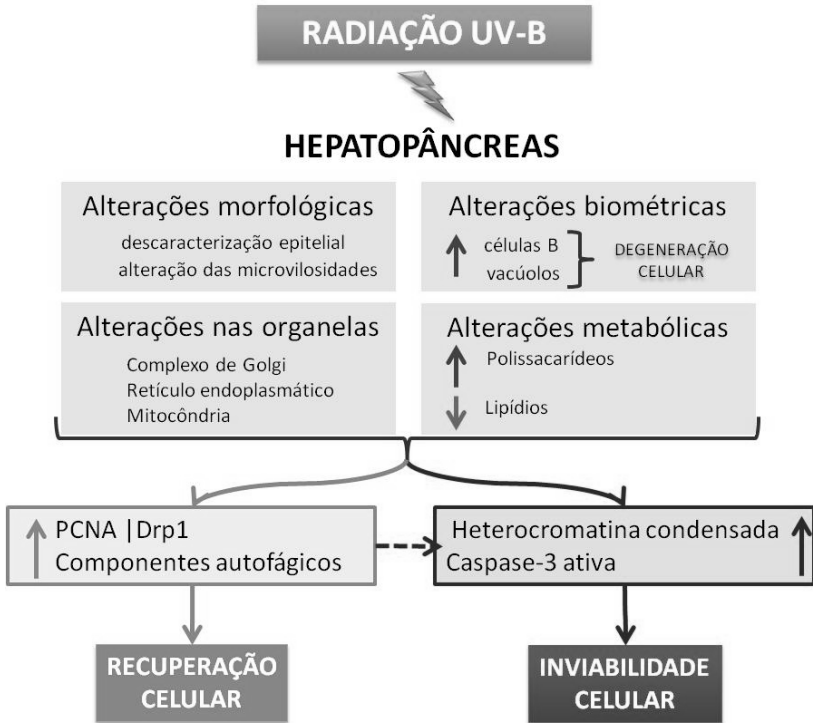


Figura 30: Esquema apresentando os resultados obtidos neste trabalho sobre o efeito toxicológico da radiação UV-B nas células epiteliais do hepatopâncreas de *Macrobrachium olfersi*. A radiação UV-B levou a alterações morfológicas no tecido e nas organelas celulares; alterações biométricas que podem estar relacionadas com o aumento da degeneração celular; e alterações no conteúdo de polissacarídeos e lipídios. O aumento da expressão das proteínas PCNA e Drp1 e dos componentes autofágicos após a irradiação indicam processos de recuperação celular, porém, se não forem eficazes podem desencadear a apoptose. O aumento da heterocromatina condensada e da expressão da caspase-3 ativa nas células irradiadas leva a inviabilidade celular.



## 5 DISCUSSÃO

O hepatopâncreas é um importante órgão para as atividades metabólicas e também é interessante para estudos de toxicidades devido à: (1) rápida resposta aos agentes estressores; (2) participação nos processos de desintoxicação; (3) função de metabolizar e armazenar proteínas, carboidratos, glicogênio e lipídios; (4) organização do órgão e dos diferentes tipos de células epiteliais, as quais apresentam dinamismo celular de proliferação, diferenciação e morte; (5) importante nos processos de muda, desenvolvimento das gônadas, manutenção do sistema digestivo e sistema imunológico (Ceccaldi, 1989; Arun e Subramaniam, 1998; Díaz et al. 2010; Roszer, 2014). Apesar da importância desse órgão, análises sobre os efeitos da radiação UV no hepatopâncreas não foram encontrados na literatura.

O presente trabalho caracterizou a organização e a dinâmica do epitélio do hepatopâncreas de *M. olfersi*, onde se analisou os cinco diferentes tipos celulares e o perfil de proliferação e morte celular por apoptose nos túbulos do hepatopâncreas. A partir desse conhecimento foi possível verificar alterações estruturais e citoquímicas nessas células após a exposição à radiação com UV-B. A espécie *M. olfersi* vem sendo utilizada em estudos sobre os efeitos da radiação UV-B e alterações nas proteínas relacionadas com estresse e morte celular já foram verificadas nos embriões dessa espécie (Nazari et al. 2010; Cardoso, 2011; Zeni et al. 2015; Quadros, 2015; Schramm, 2015). Neste estudo, os resultados indicam que a radiação UV-B foi capaz de atingir também as células epiteliais do hepatopâncreas e interferir no funcionamento celular deste órgão.

Verificou-se no presente trabalho que o hepatopâncreas de *M. olfersi*, assim como outros decápodes (Cuartas et al. 2002; Franceschini-Vicentini et al. 2009), é formado por dois lóbulos compostos por túbulos em fundo cego e que a localização dos diferentes tipos celulares epiteliais varia ao longo do túbulo. Em *M. olfersi*, as células R e F ocorrem principalmente na zona medial do túbulo e a célula B, a qual é derivada da célula F, ocorre principalmente na zona proximal. A célula fonte, nomeada por Jacobs no ano de 1928 como célula embrionária (E), no decápode *Astacus leptodactylus* (Loizzi, 1971), tem a função de proliferar e diferenciar nas células R e F, mantendo a população de células no epitélio do túbulo e repondo as células R e B degeneradas no final do processo digestório (Al-Mohanna e Nott, 1989).

No presente trabalho, a localização das células E na zona distal do túbulo do hepatopâncreas está de acordo com o que foi descrito para

outros crustáceos, como *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna e Nott, 1989), *Macrobrachium malcolmsonii* (Saravana e Geraldine, 2000) e *Macrobrachium amazonicum* (Franceschini-Vicentini et al. 2009). No entanto, foi possível observar células E em divisão nas três zonas do túbulo e essa descrição difere do que foi observado em outros crustáceos, nos quais os autores afirmam que as células E proliferam e se diferenciam na zona distal do túbulo e que se deslocam até a sua posição tubular através das ondas mitóticas (Al-Mohanna e Nott, 1989; Saravana e Geraldine, 2000; Franceschini-Vicentini et al. 2009). No grupo controle, se observou que o principal local de proliferação das células E ocorre na zona distal e em menor frequência, ocorre proliferação na zona proximal, região do túbulo do hepatopâncreas onde as células R e B degeneram devido as suas funções metabólicas. No grupo irradiado, ocorreu diminuição de proliferação na zona distal, no entanto, a zona proximal apresentou aumento da proliferação, embora não mostrando diferença estatística. Estas informações revelam o quanto o epitélio do hepatopâncreas é dinâmico e que variações podem ocorrer entre as diferentes espécies, assim como, a resposta celular pode variar dependendo do tipo de insulto.

Além dos quatro tipos celulares típicos (E, R, F, B) presentes no epitélio do hepatopâncreas dos crustáceos, foi reconhecida ainda a célula M, um quinto tipo celular que ocorre em alguns grupos, como *Penaeus semisulcatus* (Al-Mohanna et al. 1985b), *Macrobrachium amazonicum* (Franceschini-Vicentini et al. 2009) e *Farfantepenaeus brasiliensis* (Nunes et al. 2014). Pouco se conhece sobre a origem e funções dessa célula. Segundo Al-Mohanna e colaboradores (1985b) as células M obtêm substâncias proteicas vindas da hemolinfa e as transferem para as células F por meio de projeções citoplasmáticas. Levando em consideração que o hepatopâncreas é composto apenas por células epiteliais (E, R, F, B) e comparando a função exercida pela célula M com a função das outras células do epitélio tubular, é possível que a célula M também seja originada da célula fonte (E).

No presente trabalho, o epitélio do hepatopâncreas de juvenis irradiados apresentou-se descaracterizado, não sendo possível visualizar claramente os limites entre as células epiteliais, as quais também apresentaram citoplasma menos homogêneo. Essas alterações também foram descritas no hepatopâncreas de outros decápodes, como *Penaeus monodon* (Vogt, 1987), *Palaemonetes argentinus* (Sousa e Petriella, 2007) e *Chasmagnathus granulatus* (Bianchini e Monserrat, 2007) expostos a agrotóxicos e em decápodes, como *Macrobrachium rosenbergii* (Revathi et al. 2011), *Macrobrachium malcolmsonii*

(Yamuna et al. 2009) e *Scylla serrata* (Vasanthia et al. 2014) expostos a metais pesados. Essas alterações confirmam o efeito nocivo que a radiação UV-B causa nas estruturas proteicas e lipídicas celulares.

Neste trabalho foi observado aumento da vacuolização celular, o qual também é mencionado em estudos onde decápodes, como *M. rosenbergii* (Revathi et al. 2011), *Metapenaeus dobsoni* (Sreeram et al. 2005) e *Procambarus clarkii* (Anderson et al. 1997) foram expostos a metais pesados. No entanto, nesse caso, a vacuolização está relacionada com o armazenamento ou detoxicação dos metais pesados nas células R e F do hepatopâncreas. Grandes vacúolos também estão relacionados com a degeneração celular (Revathi et al. 2011). Durante a digestão ou em situações de detoxicação, as células epiteliais do hepatopâncreas secretam e acumulam materiais e, ao final do processo, grandes vacúolos são formados nas células R e B e estes são liberados no lúmen, na zona proximal do túbulo do hepatopâncreas, onde as células são degeneradas (Al-Mohanna et al. 1985a; Al-Mohanna e Nott, 1986). O aumento do número de vacúolos pode ser considerado um biomarcador sensível para a radiação UV, pois neste trabalho foi possível observar resposta tanto para a exposição de UV-B 30' quanto UV-B 60'. Concomitantemente ao aumento dos vacúolos, foi observado maior volume celular e aumento da frequência das células B no hepatopâncreas dos animais irradiados com UV-B. Estes dados indicam a ocorrência de uma extensa e contínua liberação de nutrientes estocados, os quais podem estar sendo mobilizados para os animais pela necessidade de suplementação (Al-Mohanna et al. 1985a; Sreeram et al. 2005) e, por consequência, o aumento da degeneração celular.

Por outro lado, pode estar ocorrendo um processo de degeneração patológica nas células R e B. As células epiteliais do hepatopâncreas, em especial a célula B e R, devido as suas funções digestivas e de detoxicação, apresentam vacúolos membranosos onde são verificados lipídios, membranas celulares danificadas e corpos residuais (Paquet, 1993). Esses materiais também são comumente encontrados nos autolisossomos (Moore, 1988). O aumento desses componentes lisossomais ou autofágicos é considerado como situações patológicas (Moore, 1988; Ryter, Mizumura e Choi, 2014) e também é indicativo de dano subletal intracelular causado por algum agente estressor, como a radiação UV (Hruban et al. 1963; Ericsson, 1969). As análises ultraestruturais das células R e F expostas à radiação mostraram diversas membranas celulares alteradas, as quais são nomeadas, dependendo do tipo de formação, como: corpos mielínóides, figuras mielínicas, mielinosomos, vacúolos multimembranosos e corpos multivesiculares

claros. Foram observados ainda, autofagossomos, corpos residuais eletrodensos e, provavelmente, autolisossomos. O aumento dos componentes autofágicos indica a ativação da autofagia (Chatterjee et al. 2014; Ryter, Mizumura e Choi, 2014). É possível que as células epiteliais do hepatopâncreas estejam formando autolisossomos para degradação de organelas danificadas pela indução da radiação UV-B para manter a homeostase celular e reciclagem de nutrientes.

A ativação da autofagia também foi sugerida em estudos envolvendo a exposição a metais pesados, os quais relatam a ocorrência de numerosos autolisossomos nas células do hepatopâncreas de *Sinopotamon henanense* (Liu et al. 2013; Liu, Yang, Wang, 2013) e *P. argentinus* (Vogt e Qunitio, 1994) e a presença de corpos residuais eletrodensos nas células do hepatopâncreas dos *M. borellii* e *P. argentinus* (Vogt e Qunitio, 1994; Collins, 2010), *S.henanense* (Liu, Yang, Wang, 2013), *M. malcolmsonii* (Yamuna et al. 2009), *Metapenaeus dobsoni* (Sreeram e Menon, 2005), assim como foi verificado no presente estudo.

Neste trabalho foi observada a diminuição das lipoproteínas nas células epiteliais do hepatopâncreas de *M. olfersi*, corroborando com a verificação da presença dos corpos residuais eletrodensos, os quais estão relacionados com a quebra de lipídios, glicogênio e mitocôndrias, como mencionado anteriormente. Os lipídios são importantes componentes da dieta, precursores de hormônios e cofatores, transportam vitaminas lipossolúveis, além de compor as membranas celulares (Zhao et al. 2015). Nos juvenis, os lipídios são essenciais para o crescimento e maturação da gônada (Ravichandran et al. 2009), além de ser fonte de energia para as atividades de predação (Lawrence, 1976). A redução de lipídios no hepatopâncreas foi descrita como uma resposta a diferentes estressores, como alta temperatura em *M. borellii* (Pollero et al. 1991), privação alimentar em *Porcellio scaber* (Lešer et al. 2008), presença de metais pesados em *P. laevis* (Odendaal e Reinecke, 2003) e exposição a pesticidas em *Penaeus monodon* (Vogt, 1987). A degradação do conteúdo lipídico reflete a mobilização da reserva de energia em resposta à redução da absorção de nutrientes pelo epitélio do hepatopâncreas devido à falta de alimento ou por estar sujeito a algum estresse (Mazzei et al. 2014). O estresse ocasionado pela radiação UV também pode estar levando à degradação lipídica no juvenil *M. olfersi*, alterando o bom estado fisiológico do animal e causando um prejuízo das funções das células epiteliais do hepatopâncreas.

Nas células epiteliais do hepatopâncreas, em especial nas células R, ocorre grande biossíntese de lipídios ou triacilglicerol, a qual é

iniciada nas mitocôndrias (Pellon-Maison et al. 2009). As reservas de energia nas células R são hidrolisadas nos vacúolos e transportadas pelo retículo endoplasmático liso para a hemolinfa. Nas células R maduras, os vacúolos se rompem e liberam o conteúdo lipídico e outras inclusões no lúmen, na zona proximal dos túbulos (Al-Mohanna e Nott 1987b). Essas inclusões liberadas no lúmen são provavelmente digeridas pelas enzimas produzidas pelas células F e, então, são pinocitadas pelas células B para o final da digestão e transferência para a hemolinfa novamente (Al-Mohanna et al. 1985a). Este processo celular sustenta a ideia que se observa neste trabalho: a radiação UV-B levou a uma maior degeneração celular devido ao aumento de vacúolos e alteração nas funções das células do epitélio do hepatopâncreas de *M. olfersi* devido à diminuição do conteúdo lipídico.

Os processos metabólicos que as células epiteliais do hepatopâncreas estão envolvidas mostram a importância das organelas, como a mitocôndria e o retículo endoplasmático (Al-Mohanna e Nott 1987b; Pellon-Maison et al. 2009). Neste estudo, a alteração ultraestrutural mais evidente ocorreu no perfil mitocondrial das células R e F, mas também foram observadas alterações no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, organelas importantes na síntese de proteínas e enzimas. Foram verificadas alterações nessas mesmas organelas no hepatopâncreas dos crustáceos *Scylla serrata* (Vasanthia et al. 2014), Isopoda (Mazzei et al. 2014), *S. henanense* (Liu et al. 2013; Liu, Yang, Wang, 2013), *M. borellii* e *P. argentinus* (Collins, 2010), *M. malcolmsonii* (Yamuna et al. 2009) e *Metapenaeus dobsoni* (Sreeram e Menon, 2005) expostos a metais pesados. O complexo de Golgi apresentou desagregação dos sáculos e vesículas e o retículo endoplasmático apresentou dilatações e vesicularização, bem como degranulação da membrana externa, alterações estruturais semelhantes ao que foi verificada nas células R e F do hepatopâncreas de *M. olfersi*. Outras situações de estresse, como alteração da salinidade em *P. argentinus* (Díaz et al. 2010) e contato com agrotóxicos em *P. argentinus* (Sousa e Petriella, 2007) e *Penaeus monodon* (Vogt, 1987) levaram à essas mesmas alterações nas células epiteliais do hepatopâncreas.

O retículo endoplasmático rugoso é uma organela dinâmica que responde às mudanças no ambiente celular (Jezequel et al. 1971; Köhler e Alberti, 1992). Yamuna e colaboradores (2009) sugerem que a dilatação e desintegração do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi correspondem à hiperatividade das organelas e essas alterações podem ter efeitos deletérios nas suas funções (Sreeram e

Menon, 2005). Estudos com hepatócitos de camundongo (René e Evans, 1970), epitélio oral de ratos (Liu et al. 1976) e células exócrinas pancreáticas de ratos (Türker, 2015) expostas à radiação também mostraram alterações celulares na mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, mostrando que radiação UV também pode levar a alterações ultraestruturais. Levando em conta que o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são fundamentais para as funções de secreção e digestão desempenhadas pelas células epiteliais do hepatopâncreas, alterações nessas organelas causadas pela radiação UV-B podem comprometer o bom funcionamento desse órgão.

A mitocôndria é um sistema importante de geração de energia das células e participam do metabolismo, sinalização do cálcio e apoptose, por isso, alterações mitocondriais podem levar a defeitos nos tecidos (Chan, 2006a). A morfologia tubular da mitocôndria depende do balanço entre os processos de fusão e fissão. A fissão mitocondrial é necessária durante a divisão celular para distribuir as mitocôndrias para as células filhas e também ocorre na diferenciação celular, no crescimento celular e em respostas a estímulos extracelulares (Smirnova et al. 2001). O processo de fusão e fissão mitocondrial ajuda a regular a sobrevivência celular pela preservação do número adequado de mitocôndrias em cada célula. A disfunção no processo de fissão leva à fragmentação, já a disfunção no processo de fusão leva à alongação. Enquanto a fissão mitocondrial está relacionada com a via pró-apoptótica, a fusão mitocondrial protege as células da morte celular (Karbowski et al. 2003; Chan, 2006b). Devido a essas características, o processo de fissão foi analisado neste estudo.

Em um estresse metabólico ou estímulo apoptótico, a mitocôndria pode apresentar forma esférica (Chan, 2006b; Liu et al. 2011) e a proteína Drp-1 está envolvida na regulação dessa mudança morfológica mitocondrial (Frank et al. 2001). Neste trabalho, as mitocôndrias, as quais estão concentradas principalmente ao redor do núcleo das células R e F, após a irradiação apresentaram perfil compatível com fissão mitocondrial e forma esférica. Podemos relacionar com esses dados, o aumento da expressão da proteína Drp-1, a qual foi verificada ao redor do núcleo e na região apical das células epiteliais do hepatopâncreas. Mitocôndrias esféricas e aumento da Drp1 também foram observados nas células embrionárias de *M. olfersi* irradiadas com UV-B no trabalho de Quadros (2015). A partir dessas informações, é possível que a radiação UV-B esteja desencadeando a apoptose, nas células epiteliais do hepatopâncreas, pela alteração mitocondrial, pois a permeabilização da membrana externa leva à liberação das proteínas pró-apoptóticas para o



citosol, culminando na cascata das caspases (Frank et al. 2001; Wang et al. 2011).

A fissão mitocondrial também é observada acompanhada por autofagossomos contendo mitocôndrias danificadas (Twig et al. 2008; Chang et al. 2010). Estudos mostraram que estressores ambientais, como a radiação UV, induziram a danos mitocondriais e danos persistentes ao mtDNA e sugerem que esses danos podem ser removidos pelo processo de fusão e fissão ou pela autofagia (Bess et al. 2012; 2013). Trabalhos sugerem que a autofagia inibe a apoptose pela fagocitose de mitocôndrias danificadas, evitando a liberação das proteínas pró-apoptóticas, como a caspase-3 (Yang et al. 2010). A proteína efetora da apoptose, a caspase-3, apresentou maior expressão nas células epiteliais do hepatopâncreas do grupo irradiado com UV-B. Alterações estruturais, como condensação da cromatina na membrana nuclear e rompimento da membrana mitocondrial, e aumento da expressão da caspase-3 foram verificados em *Sinopotamon henanense* exposto a metais pesados (Liu et al. 2013) e foi concluído que a indução da morte celular ocorreu pela via da apoptose no hepatopâncreas. Diante dessas informações, se supõe que as células epiteliais do hepatopâncreas de *M. olfersi* estão buscando recuperar os danos causados nas membranas celulares pela radiação UV-B através da reciclagem das organelas alteradas nos autofagossomos, no entanto, devido ao aumento das células em processo de apoptose, a viabilidade celular está sendo prejudicada.

As glicoproteínas formam uma camada de muco aderente sobre as células epiteliais digestivas (Díaz et al. 2005) e são fundamentais para importantes funções biológicas, como lubrificação, regulação iônica, proteção contra micro-organismos e degradação proteolítica, as quais estão correlacionadas com a distribuição das glicoproteínas (Diaz et al. 2001; Díaz et al. 2008).

As glicoproteínas com dióis vicinais oxidáveis e/ou glicogênio nas secreções de polissacarídeos neutros podem estar associadas na via de manutenção celular sob condições de estresses, atuando nas funções cooperativas da digestão enzimática (Srivastava et al. 2012; Tadano e Yamada, 1978), já os polissacarídeos ácidos contribuem para a proteção contra micro-organismos patogênicos e como barreira física entre a mucosa e os agentes ambientais (Arellano et al. 1999; Marchetti et al. 2006). No presente trabalho, as células epiteliais do hepatopâncreas apresentaram aumento de polissacarídeos neutros e ácidos, sendo que os polissacarídeos neutros ocorreram nos vacúolos das células F, B e, também, na célula R. A presença de polissacarídeos já foi localizada nos

vacúolos das células F e B (Ceccaldi, 1989; Toullec et al. 1992). Os camarões utilizam os carboidratos como fonte de energia no hepatopâncreas (Mohd-Shamsudin et al. 2013), para a produção de hormônios (Kleinholz, 1966) e produção de proteínas (Adiyodi & Adiyodi, 1970; Tsang et al. 2003). Portanto, alterações no armazenamento e produção desses carboidratos podem prejudicar diversas vias metabólicas realizadas no hepatopâncreas e o aumento dos polissacarídeos pode indicar uma forma de proteção contra o insulto da radiação UV-B. Estudos observaram que a expressão dessas proteínas sintetizadas no hepatopâncreas foi aumentada concomitantemente com o aumento da exposição à radiação UV-B em *Tigriopus japonicus*. Zubrzycki e colaboradores (2012) sugerem que a mobilização das proteínas como a colagenase ocorra para ajudar a prevenir os efeitos da radiação UV-B e que esse sistema seja coordenado pelo metabolismo do hepatopâncreas.

Polissacarídeos neutros estavam presentes em grande quantidade nas microvilosidades das células epiteliais do hepatopâncreas de *M. olfersi* expostos à radiação. O processo de absorção das células epiteliais ocorre nas microvilosidades e a reação de PAS nessa estrutura indica a absorção e/ou liberação de polissacarídeos neutros (Al-Mohanna et al. 1985a), como foi verificado em *F. brasiliensis* (Ceccaldi, 1989). Além dessa observação, as análises ultraestruturais deste trabalho evidenciaram alterações nas microvilosidades das células R e F do hepatopâncreas de *M. olfersi*. Nos crustáceos decápodes *Scylla serrata* (Vasanthia et al. 2014), *M. borellii* e *P. argentinus* (Collins, 2010) e isópodes (Mazzei et al. 2014) expostos a metais pesados, ocorreu a desorganização e o rompimento das microvilosidades das células R e F. Podemos supor que a radiação UV-B induz a danos nas microvilosidades, prejudicando o processo de absorção de nutrientes no hepatopâncreas de *M. olfersi*.

A expressão da proteína PCNA é induzida pela radiação UV (Scott et al. 2001; Moore et al. 2004), por esta razão foi realizada a imuno-histoquímica para essa proteína nas células epiteliais do hepatopâncreas de *M. olfersi*. Os dados mostraram aumento da expressão da proteína PCNA no citoplasma das células epiteliais dos juvenis expostos à radiação UV-B. PCNA citoplasmática está associada com diversas proteínas, desempenhando funções relacionadas com a regulação do sistema gerador de energia mitocondrial, por meio do ligante para malato desidrogenase; regulação da integridade do citoesqueleto e de outras vias de sinalização celular, por meio de ligações citoplasmáticas e com proteínas de membrana, incluindo a

anexina A2, sarcolectina, fator 1 de alongação, peptil-prolil cis-trans isomerase e proteínas ribossomais 40S; e a via da glicólise, associadas com enzimas glicolíticas (G3P-GAPDH) (Naryzhny e Lee, 2010; Olaisen et al. 2015). As enzimas GAPDH também desempenham importante papel na progressão do ciclo celular, apoptose e estresse oxidativo, através da ativação do promotor da histona 2B (Zheng et al. 2003). E, ainda, em neutrófilos, a proteína PCNA citoplasmática está envolvida na sobrevivência celular, prevenindo a ativação das pró-caspases (Witko-Sarsat et al. 2010; Chiara et al. 2012). Em face do conhecimento obtido até o momento, as funções exercidas pela PCNA no citoplasma mostram que estão relacionadas com a regulação do funcionamento celular.

No presente estudo, o epitélio do hepatopâncreas de *M. olfersi* irradiado com UV-B apresentou: descaracterização do epitélio celular do hepatopâncreas; aumento vacuolar e de polissacarídeos; diminuição lipídica; e alterações estruturais nas organelas das células R e F (Quadro 4). Apesar da presença dos componentes autofágicos, os quais reciclam as organelas evitando o prejuízo das funções celulares e o aumento da expressão da PCNA, também atuando na regulação das atividades celulares, a radiação UV-B levou à ativação do processo de apoptose, inviabilizando as células do epitélio do hepatopâncreas (Figura 30). Pode-se concluir que os danos celulares observados acarretam alterações nas funções metabólicas das células epiteliais do hepatopâncreas, prejudicando, além dos processos de absorção, secreção e digestão, a resposta imunológica, o processo de detoxicação e o crescimento e reprodução do animal.

O estudo realizado com as células epiteliais do hepatopâncreas de juvenis *M. olfersi* contribui com o conhecimento atual sobre os efeitos da radiação UV-B nos organismos aquáticos e a utilização do hepatopâncreas se mostraram adequada para a compreensão dos diferentes mecanismos celulares em resposta ao estresse. É possível verificar que algumas alterações nas organelas celulares, como a mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, ocorridas em consequência da irradiação UV-B, se repetem em células expostas a outros estressores discutidos nesse trabalho. Os resultados obtidos referentes às alterações estruturais e à presença de componentes autofágicos abrem para novas perguntas, as quais requerem a utilização de outras ferramentas bioquímicas e moleculares para melhor elucidar os diversos efeitos da radiação UV-B e as respostas celulares.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que a radiação UV-B atingiu as células epiteliais do hepatopâncreas de juvenis de *M. olfersi*, alterando a sua estrutura, organização e dinâmica celular.

O epitélio do hepatopâncreas de *M. olfersi* apresentou além dos quatro diferentes tipos celulares (E, R, F, B), um quinto tipo, a célula M, a qual não é comum em todos os crustáceos; estas células mostraram-se distribuídas de forma organizada nas zonas do túbulo do hepatopâncreas e essa organização não foi prejudicada pela ação da radiação.

As células fonte do epitélio (célula E) mostraram-se localizadas na zona distal do túbulo do hepatopâncreas, no entanto se dividem nas três zonas do túbulo, principalmente na zona distal. Esse perfil de proliferação foi alterado pela ação da radiação UV-B.

As células epiteliais do hepatopâncreas de juvenis irradiados apresentaram citoplasma menos homogêneo e descaracterização da organização epitelial. Além disso, ocorreu diminuição do conteúdo lipídico e aumento de polissacarídeos nessas células.

As membranas e organelas das células R e F do epitélio do hepatopâncreas foram danificadas após a irradiação, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi apresentaram dilatações entre as cisternas; as mitocôndrias mostraram, principalmente, redução das cristas; ocorreram danos nas microvilosidades e formação de componentes autofágicos.

Não foi possível verificar os efeitos ultraestruturais da radiação UV-B nas células E e M porque essas células são menos frequentes no epitélio tubular. Ocorreram também dificuldades em analisar as organelas das células B porque elas apresentam pouca região citoplasmática, visto que o seu vacúolo digestivo ocupa grande parte dessa região.

Os danos observados na mitocôndria das células R e F do epitélio do hepatopâncreas de *M. olfersi* foram confirmados pelo aumento da proteína Drp1, a qual está associada com a fissão e o estresse mitocondrial.

Nas células epiteliais do hepatopâncreas irradiadas com UV-B apresentaram aumento da atividade das proteínas envolvidas com o estresse celular; e, aumento de células em processo de apoptose, o que indica a diminuição da viabilidade celular.

O hepatopâncreas de *M. olfersi* mostrou-se um órgão adequado para os estudos sobre a toxicidade da radiação UV-B, podendo ser

utilizado para testes de substâncias e processos protetivos para a exposição à radiação UV; esta espécie se mostrou um animal de fácil manipulação laboratorial. Os efeitos adversos da radiação UV sobre hepatopâncreas demonstrados aqui é uma importante preocupação para o metabolismo de crustáceos, que pode ser considerada relevante para a conservação da biodiversidade e também na aquicultura.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R., HENDY, R. e GRASSO, P. 1968. Formation of myeloid bodies in rat liver lysosomes after chloroquine administration. *Exp. Mol. Pathol.* 9:212-220.
- ADAMS, N.L., CAMPANALE, J.P., FOLTZ, K.R. 2012. Proteomic responses of sea urchin embryos to stressful ultraviolet radiation. *Soc. Integr. Comp. Biol.* 1-16.
- ADIYODI, K.G. & ADIYODI, R.G. 1970. Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol. Rev.* 45:121-165.
- AHEARN, G.A., MANDAL, P.K. e MANDAL, A. 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp. Physiol. B*, 174:439-452.
- ALBERTS, B. *Biologia Molecular da Célula - 5ª Ed.* ArtMed. 2008.
- ALDAY-SANZ, V. et al. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ*, 48:91-99.
- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A., LANE, D.J.W. 1985a. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J Mar. Biol. Ass. U.K.* 65:901-910.
- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A., LANE, D.J.W. 1985b. M-'Midget' Cells in the Hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844 (Decapoda, Natantia). *Crustaceana*, 48(3):260-268.
- A1-MOHANNA, S. Y. e NOTT, J.A. 1986. B-cells and gestlon in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea Decapoda). *J Mar. Biol. Ass. U.K.* 66:403-414.
- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A. 1987a. M-midget cells and moult cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J Mar. Biol. Ass. U.K.* 67(04):803-813.

- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A. 1987b. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 95:129-137.
- AL-MOHANNA, S.Y., NOTT, J.A. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *J Mar. Biol.* 101:535-544.
- AMMAR, D., MÜLLER, Y.M.R., NAZARI, E.M. 2001. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 18(2):529-537.
- AMMAR, D. et al. 2008. New insights on the olfactory lobe of Decapod Crustaceans. *Brain Behav. Evol.* 72:27–36.
- AMMAR, D., NAZARI, E. M., MÜLLER, Y. M. R., ALLODI, S. 2013. On the brain of a crustacean: a morphological analysis of CaMKII expression and its relation to sensory and motor pathways. *Plos One*, 8:e64855.
- ANDERSON, M.B. et al. 1997. Metal Accumulation in Crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a Petroleum-Contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotox. Environ. Safe*, 37:267–272.
- ARELLANO, J. et al. 1999. Histomorphological and histochemical characteristics of the intestine of Senegal Sole, *Solea senegalensis*. *Eur. J Histochem.* 43:121-133.
- ARUN, S., SUBRAMANIAM, P. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 121:273–277.
- ARUN, S. et al. 1999. Properties of glutathione peroxidase from the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Inter. J Bioch. Cell Biol.* 31:725-732.
- BESS, A.S. et al. 2013. Effects of mutations in mitochondrial dynamics-related genes on the mitochondrial response to ultraviolet C radiation in developing *Caenorhabditis elegans*. *Worm*, 2:1, e23763.



BESS, A.S. et al. 2012. Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 1–16.

BHAVAN, P.S., GERALDINE, P. 2001. Biochemical stress responses in tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pest. Biochem. Physiol.* 70:27–41.

BIANCHINI, A. e MONSERRAT, J. M., 2007. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of sesamol. *Eco. Envir. Safe*, 67:100-108.

CAMPANALE, J.P., TOMANEK, L., ADAMS, N.L. 2011. Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 397:106–120.

CARDOSO, V.M. Efeitos da radiação ultravioleta-A e ultravioleta-B sobre os embriões do camarão de água-doce *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda) e o papel da radiação ultravioleta-A na fotorreativação. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2011.

CASTIGLIONI, D.S., OLIVEIRA, G.T., BOND-BUCKUP, G. 2006. Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Iheringia, Sér. Zool.* Porto Alegre, 96(4):413-417.

CECCALDI, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. In *Advances in Tropical Aquaculture*. Tahiti, 9:243-259.

CENTRO DE ESTUDOS CULTURA E CIDADANIA (CECA) /FUNDO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (FNMA). 1996. Uma cidade numa Ilha: relatório sobre os problemas sócio-ambientais da Ilha de Santa Catarina. Florianópolis: Insular, 88-89.

CHAN, D.C. 2006a. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125:1241-1252.

- CHAN, D.C. 2006b. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22:79–99.
- CHANG, C.R. et al. 2010. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1201:34–39.
- CHATTERJEE, S. et al. 2014. Low concentration of mercury induces autophagic cell death in rat hepatocytes. *Toxic. Ind. Health*, 30(7):611-620.
- CHIARA, A. et al. 2012. Targeting cytosolic proliferating cell nuclear antigen in neutrophil-dominated inflammation. *Front. Immunol.* 311:3.
- COLLINS, P. 2010. Environmental stress upon hepatopancreatic cells of freshwater prawns (Decapoda: Caridea) from the floodplain of Paraná River. *Nat. Sci.* 2(7):748-759.
- CORRÊA Jr., J. D., Farina, M., Allodi, S. 2002. Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules. *Tissue Cell*, 34(5):315–325.
- COUTTEAU, P., GOOSSENS, T. 2013. Aditivos inovadores para reduzir o impacto econômico de doenças na produção de camarão; *Rev. Panorama da Aquicultura*. Disponível em: [www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=1719](http://www.panoramadaaquicultura.com.br/novosite/?p=1719)).
- CUARTAS, E.I., Díaz, A.C, Petriella, A.M. 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del lagostino *Pleoticus muelleri* (BATE) (Crustacea, Penaeoidea). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.* 15:5-13.
- DENG, P. et al. 2005. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Develop. Comp. Immunol.* 29:103–112.
- DÍAZ, A.O. et al. 2005. Glycoconjugates in the branchial mucous cells of *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) (Pisces: Sciaenidae). *Sci. Mar.* 69(4):545-553.

DÍAZ, A.O. et al. 2008. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: A histochemical study. *Acta histochem.* 110:76-85.

DÍAZ, A.C., Sousa, L.G., Petriella, A.M. 2010. Functional cytology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) under osmotic stress. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 53(3):599-608.

DIFFEY, B.L. 2002. What is light? *Photodermatol Photo.* 18:68-74.

D'ORAZIO, J. et al. 2013. UV Radiation and the Skin. *Int. J Mol. Sci.* 14:12222-12248.

ERICSSON, J.L.E. 1969. Studies on induced cellular autophagy. *Exp. Cell. Res.* 55:95-106.

FRANCESCHINI-VICENTINI, L.B. et al. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int. J Morphol.* 27(1):121-128.

FRANK, S. et al. 2001. The role of Dynamin-Related Protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Devel. Cell.* 1:515-525.

GAHAN, P.B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction.* Academic Press, London, 304.

GHADIALLY, F.N. *Ultrastructural pathology of the cell and matrix.* 3rd ed. London, Butterworths, 1988.

GORDON, E.M., MCCANDLESS, E.L. 1973. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: Harvey, M.J., McLachlan, J. (Eds.), *Chondrus Crispus*: T. N. Scot. Inst. Sci., Halifax, 111-133.

GROFF, A.A. et al. 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *J Photoch. Photobio. B.* 99:93-99.

GROSS, P.S. et al. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific

white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Develop. Comp. Immunol.* 25:565-577.

HÄDER, D.P. et al. 2003. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol.* 2:39–50.

HÄDER, D.P. et al. 2011. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol.* 10:242.

HANS, F. e DIMITROV, S. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20:3021-3027.

HOLTHUIS, L.B. 1980. FAO species catalogue. shrimps and prawns of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome. 125(1):1-126.

HRUBAN, M.D.Z. et al. 1963. Focal cytoplasmic degradation. *Am. J. Pathol.* 42(6):657-683.

HUANG, J. e KLIONSKY, D.J. 2007. Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, 6(15):1837-49.

JAO, W.M.D. et al. 1983. Myeloid bodies in drug-induced acute tubular necrosis. *J Pathol.* 139:33-40.

JEZEQUEL, A.M. et al. 1971. Changes of the smooth endoplasmic reticulum induced by rifampicin in human and guinea-pig hepatocytes. *Gut*, 12:984-987.

JI, P. et al. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish Shellfish Immun.* 27:563–570.

JIRAVANICHPAISAL, P. et al. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211:213–236.

JOHANSSON, M.W. et al. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191:45–52.

- KARBOWSKI, M., Youle, R.J. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10:870–880.
- KARSTEN, U. 2008. Defense strategies of algae and cyanobacteria against solar ultraviolet radiation, in *Algal Chemical Ecology*, ed. C. D. Amsler, Springer, Berlin Heidelberg, 273-296.
- KAY, W.W. & WHITEHEAD, R. 1935. The staining of fat with Sudan IV. *J Path. Bact.* 41:303-304.
- KELMAN, Z. 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14:629-640.
- KIM, R. et al. 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the *Monogonont rotifer*, *Brachionus* sp. *Aquat. Toxicol.* 101:529–539.
- KIRCHHOFF, V.W.J.H. et al. 2000. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. *Braz. J Geophys.* 18:63-74.
- KLEINHOLZ, L.H. 1966. Separation and purification of crustacean eyestalk hormones. *Amer. Zool.* 6:161-167.
- KÖHLER, H.R e ALBERTI, G. 1992. The effect of heavy metal stress on the intestine of diplopods. *Ber. Naturwiss. Med. Ver. Innsb.* 10(suppl.):257-267.
- KUWAHARA, V.S. et al. 2000. Variability of bio-optical factors influencing the seasonal attenuation of ultraviolet radiation in temperate coastal waters of Japan. *Photoch. Photobiol.* 72(2):193–199.
- LACUNA, D.G., UYE, S. 2001. Influence of mid-ultraviolet (UVB) radiation on the physiology of the marine planktonic copepod *Acartia omorii* and the potential role of photoreactivation. *J Plankton Res.* 23(2):143-155.
- LANG, V.R. 1973. The ontogenetic development of *Maja squinado* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda, Brachyura) with special view on

the embryonic nutrition and the development of the interstitium. Zool. Jb. Anat. Bd. 90:389-449.

LAWRENCE, J.M. 1976. Patterns of lipid storage in post-metamorphic marine invertebrates. Am. Zool. 16(4):747-762.

LEŠER, V. et al. 2008. Epithelial thickness and lipid droplets in the hepatopancreas of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) in different physiological conditions. Zoology, 111:419–432.

LESSER, M.P. 2010. Depth-dependent effects of ultraviolet radiation on survivorship, oxidative stress and DNA damage in sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) embryos from the Gulf of Maine. Photochem. Photobiol. 86:382–388.

LI, C. et al. 2008. Pathology and hematology of the Caribbean spiny lobster experimentally infected with Panulirus argus virus 1 (PaV1). Virus Res. 132:104–113.

LI, P. et al. 2010. Identification, mRNA expression and characterization of proliferating cell nuclear antigen gene from Chinese Mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*. Comp. Biochem. Phys. A, 157:170–176.

LI, X. et al. 2013. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways from hepatopancreas of microbial challenged Mitten crab *Eriocheir sinensis*. Plos One. 8(7):e68233.

LIU, H.M. et al. 1976. An ultrastructural study of the effects of x-irradiation on the oral epithelium of the rat: qualitative aspects. J Oral Pathol. 5:194-208.

LIU, D. et al. 2011. Mitochondrial pathway of apoptosis in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 105(3-4):394-402.

LIU, D. et al. 2013. Cd-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. Plos One. 8(7):e68770.

- LIU, D., YANG, J., WANG, L. 2013. Cadmium induces ultrastructural changes in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Micron*, 47:24–32.
- LLABRÉS, M. et al. 2012. Impact of elevated UVB radiation on marine biota: a meta-analysis. *Global Ecol. Biogeogr.* 22:131-144.
- LOIZZI, R.F. e PETERSON, D.R. 1971. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B:227-236.
- LOIZZI, R.F. 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z. Zellforsch.* 113:420-440.
- LÓPEZ-LÓPEZ, S. et al. 2003. Characterization of digestive gland esterase–lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp. Biochem. Phys. B*, 135:337–347.
- MANDARIM DE LACERDA, C.A. 2003. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75(4):469-486.
- MANNEY, G.L. et al. 2011. Unprecedented Arctic ozone loss in 2011. *Nature*, 478:469-478.
- MANOSATHIYADEVAN, M., SELVISABHANAYAKAM, VELAYUDHAN, D. 2013. Metabolic and antioxidant enzyme activity in hepatopancreas of the adult male freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) exposed to Paravandar river pollutants. *Int. J. Res. BioSci.* 2(1):83-91.
- MARCHETTI, L. et al. 2006. Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Issue Journal of Fish Biology. J Fish Biol.* 68(6):1808–1821.
- MARCOLIN, C.R. et al. 2008. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos estádios de intermuda e pré-muda inicial. *Zoociências*, 10(2):97-104.

- MAVERAKIS, E. et al. 2010. Light, including ultraviolet. *J Autoimmun.* 34:247-257.
- MAZZEI, V. et al. 2014. Bioaccumulation of cadmium and lead and its effects on hepatopancreas morphology in three terrestrial isopod crustacean species. *Ecotox. Environ. Safe*, 110:269-279.
- MCILWAIN, D.R., BERGER, T. e MAK, W.M. 2013. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a008656.
- MCKENZIE, R.L. et al. 2011. Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2010 assessment. *Photochem. Photobiol.* 10:182.
- MIZUSHIMA, N. et al. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182):1069–1075.
- MIZUSHIMA, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:132–139.
- MOHD-SHAMSUDIN, M.I. et al. 2013. In-depth transcriptomic analysis on giant freshwater prawns. *Plos One*, 8(5):e60839.
- MOLINA, M.J., Rowland, F.S. 1974. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature*, 249:810-812.
- MONTOYA, J.V. 2003. Freshwater Shrimps of the Genus *Macrobrachium* Associated with Roots of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth) in the Orinoco Delta (Venezuela). *Caribbean J Sci.* 39(1):155-159.
- MONTOYA, J. 2010. The reproductive conditions of male shrimps, genus *Penaeus*, sub-genus *Litopenaeus* (open thelyca penaeoid shrimps): A review. *Aquaculture*, 300:1-9.
- MOORE, J.O. et al. 2004. Effects of ultraviolet B exposure on the expression of proliferating cell nuclear antigen in murine skin. *Photochem. Photobiol.* 80:587-595.



MOORE, M.N. 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol.* 46:81-89.

MORESINO, R.D.H., GONÇALVES, R.J., HELBLING, W. E. 2011. Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407:363–369.

MÜLLER, Y.M.R. 1984. The embryonic development of *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia). *Zool. Jb. Anat.* 112:51-78.

MÜLLER, Y.M.R., PRAZERES, A.C. 1992. Influência da salinidade e temperatura da água sobre a captura de *Macrobrachium olfersi* (WIEGMANN, 1836) coletados no canal da Lagoa do Peri - Florianópolis/SC. *Acta Limnol. Brasil*, 4:175-183.

MÜLLER, Y.M.R. et al. 1996. Aspectos da reprodução de *Palaemon pandalliformis* (STIMPSON) (DECAPODA, PALAEMONIDAE) no manguezal de Ratoles, Florianópolis, Santa Catarina. *Revta Bras. Zool.* 13(3):633-642.

MÜLLER, Y.M.R., NAZARI, E.M., SIMÕES-COSTA, M.S. 2003. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *J Crust. Biol.* 23:869-875.

MÜLLER, Y.M.R., AMMAR D., NAZARI, E.M. 2004. Embryonic development of four species of Palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revta Bras. Zool.* 21:27-32.

NAGARAJU, G.P.C. 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *J Exper. Biol.* 214:3-16.

NARYZHNY, S.N. e LEE, H. 2010. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Letters*, 584:4292–4298.

NAZARI, E.M. et al. 2003. Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuna* and

*Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). J Crust. Biol. 23:862-868.

NAZARI, E.M. Alterações morfológicas e celulares induzidas pela radiação ultravioleta B em embriões do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Ciências Biomédicas, 2010.

NAZARI, E.M. et al. 2010. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. Aquat. Toxicol. 98(1):25-33.

NAZARI, E.M., Ammar, D., Müller, Y. M. R., Allodi, S. 2013. Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. In: Silvana Allodi; Evelise Maria Nazari. (Org.). Exploring Themes on Aquatic Toxicology. 1ed. 1:1-16.

NOLASCO, H. et al. 2006. Digestibilidade *in vitro* de lipídios alimentarios para el Camarón. In: VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, ISBN, 970-694-333-5.

NUNES, E.T. et al. 2014. Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817. Acta Histochem. 116:243–251.

ODENDAAL, J.P., REINECKE, A.J. 2003. Quantifying histopathological alterations in the hepatopancreas of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda) as a biomarker of cadmium exposure. Ecotox. Envir. Safe, 56:319–325.

ODINETZ-COLLART, O., RABELO, H. 1996. Variation in egg size of the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). J Crust. Biol. 16(2):684-688.

OLAISEN, C. et al. 2015. PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling. Cell Signall. 27:1478–1487.

OLSON, M.H., BARBIERI, N.E. 2014. Mechanisms of ultraviolet radiation tolerance in the freshwater *Snail Physa acuta*. *Freshwater Sci.* 33(1):66-72.

PAQUET, F. et al. 1993. Accumulation of  $^{241}\text{Am}$  in subcellular structures of the hepatopancreas of the lobster *Homarus gammarus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 95:155-162.

PELLON-MAISON, M. et al. 2009. *Macrobrachium borellii* hepatopancreas contains a mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase which initiates triacylglycerol biosynthesis. *Lipids*, 44(4):337.

POLLERO et al. 1991. Lipid classes' consumption related to fasting and thermal stress in the shrimp *Macrobrachium Borellii*. *Comp. Biochem. Phys.* 99B(1):233-238.

QUADROS, T. 2015. Análise ultraestrutural e molecular das células de embriões de camarão de água doce expostos à radiação ultravioleta B. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2015.

QUEIROZ, L.D., ABRUNHOSA, F.A., MACIEL, C.R. 2011. Ontogenesis and functional morphology of the digestive system of the freshwater prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae). *Zoologia*, 28(3): 395–402.

RAMADEVI, K.R.L.S. et al. 1990. Observation on the hepatopancreas of *Ocypoda platytarsis* (Milne-Edwards) (Crustacea, Brachyura). *B. Zool.* 57(3):261-265.

RAVICHANDRAN, S. et al. 2009. Variation in lipid concentration of the crab *Portunus sanguinolentus* At Different Developmental Stages. *Middle-East J Sci. Res.* 4(3):175-179.

RENÉ, A.A., EVANS, A.S. 1970. Correlation of radiation-induced ultrastructural changes in mouse hepatocytes with alterations in plasma concentration of protein-bound neutral hexose. *Radiat. Res.* 44:(1):224-236.

REVATHI, P. et al. 2011. Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotox. Envir. Safe*, 74:623-629.

REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17:208–212.

RODRIGUEZ, C.A. et al. 2000. Impact of solar ultraviolet radiation on hatching of a marine copepod, *Calanus finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 193:85-93.

ROSZER, T. 2014. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Res.* 358:685–695.

ROUX, M.M. et al. 2002. The lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-Glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J Virol.* 76(14):7140–7149.

RYTER, S.W., CHOI, A.M.K. 2013. Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress. *Curr. Pharm. Des.* 19:2747-2756.

RYTER, S.W., MIZUMURA, K., CHOI, A.M.K. 2014. The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities. *Inter. J Cell Biol.* 502676:12.

SCHMIDT, E. C. et al. 2012. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, 41:919–930.

SCHRAMM, H. Análise espaço-temporal da expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico em embriões de camarão *Macrobrachium olfersi* expostos à radiação ultravioleta B. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2015.

SCOTT, M. et al. 2001. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci.* 114:3455-3462.

SHANKLIN, J. 2010. Reflections on the ozone hole. *Nature*, 465:34-35.

SIMÕES-COSTA, M.S. et al. 2005. Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Revta Bras. Zool.* 22:501-508.

SMIRNOVA, E. et al. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 12:2245–2256.

SOUSA, L.G., PETRIELLA, A.M. 2007. Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): influence of environmental pollution. *Rev. Biol. Trop.* 55:79-86.

SOUSA, L.G., CUARTAS, E.I., PETRIELLA, A.M. 2005. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. *Biocell*, 29(1):25-31.

SREERAM, M.P., MENON, N.R. 2005. Histopathological changes in the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni* exposed to petroleum hydrocarbons. *J. Mar: Biol. Ass. India*, 47(2):160-168.

SRIVASTAVA et al. 2012. Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the epidermis of the head skin of Indian Major carp, *Labeo rohita*. *Tissue Cell*, 44:409-417.

SUBRAMONIAM, T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp. Biochem. Phys. C*, 125:135–156.

SUN, S. et al. 2014. Identification of differentially expressed genes in hepatopancreas of oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* exposed to environmental hypoxia. *Gene*, 534:298–306.

TADANO, Y., YAMADA, K. 1978. The histochemistry of complex carbohydrates in the ovarian follicles of adult mice. *Histochemistry*, 57:203-215.

TARTAROTTI, B. et al. 2014. UV-induced DNA damage in *Cyclops abyssorum taticus* populations from clear and turbid alpine lakes. *J Plankton Res.* 36(2):557–566.

- TOULLEC, J.Y. et al. 1992. In vitro protein synthesis and amylase activity in F cells from hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea; Decapoda). *Experientia*, 48.
- TRAVIS, D.F., TRAVIS, A. 1972. Ultrastructural changes in the left ventricular rat myocardial cells with age. *J Ultra. Res.* 39:124-148.
- TSANG, W.S. et al. 2003. Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas. *Gene*, 303:99–109.
- TÜRKER, H. 2015. The effect of ultraviolet radiation of pancreatic exocrine cells in mole rats: An ultrastructural study. *J Radiat. Res. App. Sci.* 8:49-54.
- TWIG, G. et al. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*, 27:433–446.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP), Ozone Secretariat, 2000. The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. Nairobi Kenya, 2000. Disponível em: <http://ozone.unep.org/pdfs/Montreal-Protocol2000.pdf>
- VASANTHIA, L.A. et al. 2014. The application of histopathological biomarkers in the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) to assess heavy metal toxicity in Pulicat Lake, Chennai. *Mar. Pollut. Bull.* 81:85-93.
- Ventrella, M.C. et al. Métodos histoquímicos aplicados às sementes. Viçosa, MG, Ed. UFV, 2013.
- VIARENGO, S. et al. 1989. Purification and biochemical characterization of a lysosomal copper-rich thionein-like protein involved in metal detoxification in the digestive gland of mussels. *Comp. Biochem. Phys.* 93(2):389-395.
- VOGT, G., QUINTIO, E.T. 1994. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. *Aquat. Toxicol.* 28:223-241.

VOGT, G. 1987. Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. *Aquaculture*, 67:157-164.

WANG, Z. et al. 2011. The Mitochondrial Phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148:228–243.

WARRIER, S.R. et al. 2001. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp. Biochem. Phys. A*, 130:283-294.

WEEL, P.B.V. 1973. "Hepatopancreas"? *Comp. Biochem. Phys.* 47A:1-9.

WEI, Y. et al. 1999. Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation. *Cell*, 97:99-109.

WITKO-SARSAT, V. et al. 2010. Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J Exp. Med.* 207(12):2631-2645.

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (WMO), UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP), 2002. Executive summary, Scientific assessment of ozone depletion: 2002. Prepared by the Scientific Assessment Panel of the Montreal Protocol on Substances that Deplete Ozone Layer.

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION (WMO), 2014. Assessment for Decision-Makers Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2014. Global Ozone Research and Monitoring Project. Report: 56, Geneva, Switzerland. Disponível em: [http://ozone.unep.org/Assessment\\_Panels/SAP/SAP2014\\_Assessment\\_for\\_Decision-Makers.pdf](http://ozone.unep.org/Assessment_Panels/SAP/SAP2014_Assessment_for_Decision-Makers.pdf)

YAMAGUCHI, T. 2001. Seasonal change of the hepatopancreas index in the males of the fiddler crab, *Uca lactea*. *Crustaceana*, 74(7):627-634.

YAMUNA, A. et al. 2009. Ultrastructural observations in gills and hepatopancreas of prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to mercury. *J Environ. Biol.* 30(5):693-699.

YANG, Z. et al. 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 22(2):124-31.

ZENI, E.C. et al. 2015. Light-mediated DNA repair prevents UVB-induced Cell cycle arrest in embryos of the crustacean *Macrobrachium olfersi*. *Photochem. Photobiol.* 91(4):869-78.

ZHAO, J. et al. 2015. Effects of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and antioxidants of juvenile mud crab *Scylla paramamosain* (Estampador). *Aquaculture*, 435:200–206.

ZHENG, L. et al. 2003. S phase activation of the Histone H2B Promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*, 114(2):255–266.

ZILLI, L. et al. 2003. Changes in cell type composition and enzymatic activities in the hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* during the moulting cycle. *J Comp. Physiol. B.* 173: 355–363.

ZUBRZYCKI, I.Z. et al. 2012. The study on highly expressed proteins as a function of an elevated ultraviolet radiation in the copepod, *Tigriopus japonicus*. *Ocean Sci. J.* 47(2):75-82.