

Dissertação de mestrado para a
obtenção do Título de Mestre em
Biologia Celular e do
Desenvolvimento

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

Valquíria Machado Cardoso

Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento

Dissertação de mestrado para a obtenção
do Título de Mestre em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Florianópolis, 2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C268e Cardoso, Valquíria Machado
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] / Valquíria Machado Cardoso ; orientadora, Yara Maria Rauh Müller. - Florianópolis, SC, 2011.

112 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Biologia celular. 2. Radiação ultravioleta. 3. Ambiente Aquático. 4. Desenvolvimento Embrionário. 5. Crustáceo. I. Muller, Yara Maria Rauh. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

CDU 576

Agradecimentos

Agradeço aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram desde a época em que fazer a pós-graduação era apenas um sonho.

Agradeço aos professores, colegas e funcionários da UFSC, por terem sido tão receptivos comigo.

Por fim, agradeço especialmente aos professores e colegas do *nosso* laboratório por todos os momentos que passamos juntos, os de trabalho e pesquisa, os difíceis e decisivos e os banais e divertidos, que acabaram nos fazendo mais do que colegas, fizeram-nos amigos.

Resumo

Cardoso, Valquíria Machado. 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 em Biologia Celular e do Desenvolvimento - Universidade Federal de Santa Catarina).

Nas últimas décadas os pesquisadores têm voltado sua atenção para os efeitos da crescente incidência da radiação ultravioleta (UV) nos ecossistemas. A radiação UV pode causar efeitos diferenciados nos organismos, sendo conhecido o papel da radiação ultravioleta-A (UV-A) no processo de fotorreativação celular, recuperando danos causados pela radiação ultravioleta-B (UV-B). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o efeito das radiações UV-A e UV-B sobre os embriões do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* em três idades ao longo do desenvolvimento: idade 1 (E1-E6), idade 2 (E7-E9) e idade 3 (E10-E14). As fêmeas ovígeras foram submetidas aos seguintes procedimentos de irradiação: (1) exposição à radiação UV-A por 60 min.; (2) exposição à radiação UV-B por 30 min.; (3) exposição à radiação UV-B por 30 min., seguida de exposição à radiação UV-A por 60 min. Fêmeas ovígeras não irradiadas foram utilizadas como controle. Após os procedimentos de irradiação, as fêmeas foram mantidas por 4 dias no escuro, para então serem realizadas as análises macro e microscópicas. Nossos resultados mostram um aumento no volume dos ovos e atraso no ritmo do desenvolvimento dos embriões da idade 1 expostos à radiação UV-A, UV-B e UV-B+UV-A. Alterações morfológicas externas foram observadas nos embriões das idades 2 e 3, submetidos a todos os procedimentos de radiação. As análises por imuno-histoquímica mostraram que a expressão das proteínas envolvidas nas vias apoptóticas, como caspase 8, caspase 3, Bak e Bcl2, assim como as proteínas induzidas pelo estresse celular p53 e Hsp70, foram alteradas pela radiação UV-A e UV-B. A expressão da proteína p53 foi aumentada somente nos embriões expostos à radiação UV-A na idade 1. A expressão da caspase 8 foi maior em todas as idades nos embriões irradiados com UV-A e UV-B, contudo

nos embriões irradiados com UV-B+UV-A foi observado aumento da expressão de caspase 8 somente na idade 3. Embriões expostos à radiação UV-B+UV-A apresentaram uma diminuição da expressão da Bcl2, p53 e Hsp70 nas idades 2 e 3. As análises por imunohistoquímica mostraram ainda que houve pouca variação na proliferação celular, identificada pela expressão da proteína fosfo-histona H3. Em síntese, nossos resultados mostram que (1) os embriões de *M. olfersi* irradiados nas idades 1, 2 e 3 apresentaram alterações na morfologia externa e na expressão das proteínas analisadas; (2) os embriões expostos às radiações UV-A ou UV-B separadamente apresentam importantes alterações morfológicas e comprometimentos na expressão das proteínas p53 e Hsp70; (3) os embriões expostos à radiação UV-B seguida pela radiação UV-A apresentam efeitos mais atenuados, quando comparados aos embriões irradiados com UV-A ou UV-B separadamente.

Palavras-chave: Radiação UV; ambiente aquático; desenvolvimento embrionário; crustáceo.

Abstract

Cardoso, Valquíria Machado. Effects of ultraviolet-A and ultraviolet-B on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda) embryos and the ultraviolet-A roles on photoreactivation. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento - Universidade Federal de Santa Catarina).

In recent decades, researchers have been focused their attention in the effects of increasing incidence of ultraviolet (UV) radiation on ecosystems. The UV radiation can cause diverse effects on organisms, being recognized the roles of the ultraviolet-A (UV-A) radiation on the cellular photoreactivation, recovering the damages caused by ultraviolet-B (UV-B). The aim of this study was to characterize the effects of UV-A and UV-B radiation on embryos of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* in three ages throughout development: age 1 (from E1 to E6), age 2 (E7-E9) and age 3 (E10-E14). Ovigerous females were submitted to the irradiation procedures: (1) exposure to UV-A radiation for 60 min.; (2) exposure to UV-B radiation for 30 min.; (3) exposure to UV-B radiation for 30 min. followed by the exposure to UV-A radiation for 60 min. Non-irradiated ovigerous females were used as control. After irradiation procedures, ovigerous females were kept for 4 days in the dark, and then were realized the macro- and microscopic analyses. Our results showed an increase in the egg volume and delay in the developmental rhythm of the embryos at age 1 which were exposed to UV-A, UV-B and UV-B followed by UV-A. External morphological alterations were observed in embryos of ages 2 and 3, which were submitted to all radiation procedures. Immunohistochemistry analyses showed that the expression of proteins involved on apoptotic pathways, as caspase 8, caspase 3, Bak, as well as, the proteins induced by cellular stress, p53 and Hsp70, were altered by UV-A and UV-B radiation. In embryos irradiated with UV-A on age 3, was observed an increase on expression of every studied protein. The expression of p53 protein was increased only on embryos exposed to UV-A radiation on age 1. The expression of caspase 8 was higher in all ages of the embryos exposed to UV-A and UV-B radiation, however, in embryos exposed to UV-B followed UV-A

high expression of caspase 8 occurred only at age 3. Embryos exposed to UV-B followed UV-A radiation showed a decrease of expression of Bcl2, p53 and Hsp70 at ages 2 and 3. Immunohistochemistry analysis also showed slight variation on cell proliferation, identified by the expression of phosphohistone H3 protein. In general, was verified that embryos exposed to UV-B followed UV-A showed few variation on expression of analyzed proteins when compared to embryos exposed to UV-A or UV-B separately. In summary, our results showed that (1) the embryos of *M. olfersi* exposed at ages 1, 2 and 3 exhibited alterations on external morphology and on expression of the analyzed proteins; (2) the embryos exposed to UV-A and UV-B separately, showed important morphological alterations and impairments on the expression of p53 and Hsp70; (3) embryos exposed to UV-B followed UV-A radiation showed more attenuated effects when compares to embryos irradiated with UV-A or UV-B separately.

Palavras-chave: UV radiation; aquatic environment; embrionic development; crustacean.

Lista de abreviaturas

6-4PP	(6-4) fotoprodutos
ANOVA	teste de análise de variância
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	adenosina trifosfato
Bad	<i>BCL2-antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x _L	<i>B cell lymphoma xL</i>
BFC	bromofluorcarbono
BH	domínios Bcl2
Bid	<i>interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2-L11</i>
BSA	albumina sérica bovina
Ca ²⁺	cálcio
Caspase	<i>cysteine-aspartic-acid-proteases</i>
CFC	clorofluorcarboneto
CH ₄	metano
CO ₂	dióxido de carbono
CPD	dímeros de pirimidina ciclobutano
DAB	3,3' diaminobenzidina
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol
DISC	complexo de sinalização/indução de morte
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOC	carbono orgânico dissolvido
E	dia embrionário
FADD	<i>FAS-associated death domain</i>
HE	hematoxilina e eosina
HFC	hidrofluorcarbono
Hsp	proteínas de choque térmico
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
MAA	aminoácidos micosporina
mf	massa fresca
ms	massa seca
NA	densidade numérica de células marcadas por área
N ₂ O	óxido nitroso
NER	reparo por excisão de nucleotídeo
O	oxigênio livre
O ₂	molécula de oxigênio

O ₃	ozônio
p53AIP1	<i>p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1</i>
PBS	tampão fosfato salino
PFC	perfluorcarbono
PHH3	histona H3 fosforilada
POC	carbono orgânico em partícula
PRR	radiação fotorreparadora
RE	retículo endoplasmático
ROS	espécies reativas de oxigênio
SF6	hexafluoreto de enxofre
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UV	ultravioleta
UV-A	ultravioleta-A
UV-B	ultravioleta-B
UV-C	ultravioleta-C

Lista de figuras, quadros e tabelas

Figura 1: Via de reparo do DNA por excisão de nucleotídeo.....	32
Figura 2: Via de reparo do DNA por fotorreativação.....	33
Figura 3: Via apoptótica extrínseca e interação desta via com a via intrínseca.....	34
Figura 4: Via intrínseca apoptótica.....	35
Figura 5: Interação da proteína p53 com as proteínas da família Bcl2.....	38
Figura 6: Aquário portátil de transporte dos camarões (a) e aquário de 30 L para climatização.....	44
Figura 7: Fêmea adulta ovígera do camarão <i>M. olfersi</i>	46
Figura 8: Exemplo de uma série de lâminas confeccionadas com os cortes das amostras incluídas em Paraplast®.....	47
Figura 9: Efeitos das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A no volume do ovo de <i>M. olfersi</i> nas três idades embrionárias.....	53
Figura 10: Efeitos das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A na porcentagem de água dos ovos de <i>M. olfersi</i> nas três idades embrionárias.....	54
Figura 11: Efeitos das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A na média do índice do olho de embriões de <i>M. olfersi</i>	55
Figura 12: Porcentagem total de alterações morfológicas externas em embriões de <i>M. olfersi</i>	56
Figura 13: Embriões de <i>M. olfersi</i> controle nas idades 1, 2 e 3 (A) apresentando suas características morfológicas externas típicas e tipos de alterações morfológicas externas observadas em embriões irradiados com UV (B).....	59
Figura 14: Porcentagem de alterações nas estruturas embrionárias de <i>M. olfersi</i> nas idades embrionárias 2 e 3.....	60
Figura 15: Esquemas (a, d, g), fotos do embrião <i>M. olfersi</i> <i>in vivo</i> (b, e, h) e em cortes sagitais corados com HE (c, f, i) nas três idades embrionárias.....	61
Figura 16: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-fosfo-histona H3.....	62
Figura 17: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para fosfo-histona H3 nas três idades embrionárias.....	62
Figura 18: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-caspase 8 (a, b, c, d) e anti-caspase 3 (e, f, g, h).....	64
Figura 19: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para caspase 8 e caspase 3, na idade 1.....	64

Figura 20: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-caspase 8 (a, b, c, d) e anti-caspase 3 (e, f, g, h).....	65
Figura 21: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para caspase 8 e caspase 3 na idade 2.....	65
Figura 22: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-caspase 8 (a, b, c, d), anti-caspase 3 (e, f, g, h) e imuno-histoquímica de fluorescência utilizando o anticorpo anti-caspase 3 e DAPI (i, j, k).....	66
Figura 23: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para caspase 8 e caspase 3 na idade 3.....	66
Figura 24: Imuno-histoquímica para microscopia de fluorescência utilizando o anticorpo anti-Bak.....	67
Figura 25: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para Bak nas três idades embrionárias.....	68
Figura 26: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-Bcl2.....	69
Figura 27: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para Bcl2 nas três idades embrionárias.....	70
Figura 28: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-p53.....	71
Figura 29: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para p53 nas três idades embrionárias.....	72
Figura 30: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-Hsp70.....	73
Figura 31: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para Hsp70 nas três idades embrionárias.....	74
Figura 32: Imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-dímero de pirimidina.....	74
Quadro 1: Organização das idades embrionárias com base nas características do desenvolvimento do olho.....	44
Quadro 2: Definição dos grupos experimentais adotados no presente estudo.....	45
Quadro 3: Características dos anticorpos primários utilizados nas marcações celulares por imuno-histoquímica.....	49
Quadro 4: Visão geral do conjunto de resultados.....	76
Tabela 1: Descrição de alguns dos efeitos biológicos causados pela radiação UV em diferentes organismos.....	25

Tabela 2: Porcentagem de atraso no ritmo do desenvolvimento dos embriões de <i>M. olfersi</i> nas idades 1, 2 e 3 nos diferentes grupos experimentais.....	55
Tabela 3: Descrição das alterações observadas nos embriões de <i>M. olfersi</i> e a porcentagem em cada um dos grupos e idades analisadas.....	57

Sumário

Resumo.....	9
Abstract.....	11
Lista de abreviaturas.....	15
Lista de figuras, quadros e tabelas.....	17
1. Introdução.....	23
1.1 Radiação solar e a camada de ozônio.....	23
1.2 Efeitos da radiação UV nos ambientes aquáticos.....	29
1.3 Mecanismos de defesa dos organismos aquáticos.....	30
1.4 Efeitos da radiação UV nos organismos aquáticos.....	38
1.5 Justificativa.....	40
2. Objetivos.....	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. Materiais e métodos.....	43
3.1 Modelo Animal.....	43
3.2 Captura dos animais.....	43
3.3 Aclimação e reprodução dos animais em aquário.....	43
3.4 Grupos experimentais.....	45
3.5 Procedimento de irradiação.....	45
3.6 Análise da morfologia externa dos embriões e do ritmo do desenvolvimento.....	46
3.7 Determinação do volume dos ovos e índice do olho dos embriões.....	46
3.8 Determinação da massa fresca e seca dos ovos.....	47
3.9 Preparo dos embriões para análises microscópicas.....	47
3.10 Marcações celulares por imuno-histoquímicas.....	48
3.11 Análises dos resultados.....	51
3.12 Análises estatísticas.....	51
4. Resultados.....	53
4.1 Análises biométricas dos ovos e embriões.....	53
4.2 Análises do ritmo do desenvolvimento.....	55
4.3 Alterações morfológicas externas dos embriões.....	56
4.4 Análises da morfologia interna dos embriões.....	60
4.5 Proliferação celular.....	61
4.6 Apoptose.....	63
4.7 Danos no citoplasma e no núcleo.....	70
4.8 Dímeros de pirimidina.....	74
5. Discussão.....	81
5.1 Efeitos da radiação UV na idade 1.....	82

5.2 Efeitos da radiação UV na idade 2.....	83
5.3 Efeitos da radiação UV na idade 3.....	84
5.4 Dímeros de pirimidina.....	87
5.5 Fotorreativação da radiação UV-A.....	87
5.6 Considerações finais.....	90
6. Referências bibliográficas.....	91

1. Introdução

Nas últimas décadas os pesquisadores tem voltado sua atenção para os efeitos da radiação ultravioleta (UV) nos ecossistemas terrestres e aquáticos. A radiação solar é essencial para o funcionamento dos ecossistemas, mas somente com o surgimento da camada de ozônio, cujo papel é absorver as ondas curtas da radiação UV emitida pelo sol, foi possível bloquear a incidência terrestre da radiação UV-C, a mais nociva das três frequências de ondas. Desta forma, a radiação UV-A e parte da radiação UV-B atingem à superfície terrestre. Com a descoberta do buraco na camada de ozônio, os pesquisadores também evidenciaram que as emissões de gases na atmosfera tendem a intensificar este fenômeno, tornando-a cada vez mais rarefeita e, conseqüentemente, aumentando a incidência da radiação UV-B nos ambientes terrestre e aquático (Kirchhoff *et al.*, 2000).

A radiação UV possui amplos efeitos biológicos, os quais já foram observados em diversos organismos, atuando no metabolismo normal ou podendo causar efeitos nocivos que podem ser observados morfológicamente e molecularmente (Diffey, 2002; Maverakis *et al.*, 2010). A radiação UV-A, em particular, pode recuperar os danos causados pela radiação UV, uma vez que atua no processo de fotorreativação celular (Applegate e Ley, 1988; Naganuma *et al.*, 1997). Nos organismos aquáticos, foco da presente dissertação, conhecem-se algumas estruturas e mecanismos utilizados como proteção e defesa contra agentes estressores, como a radiação UV (Vega e Epel, 2004; Olson e Mitchell, 2006). Porém, o conhecimento acerca dos efeitos celulares e moleculares é limitado, principalmente nos embriões expostos à radiação UV.

1.1 Radiação solar e a camada de ozônio

O Sol é responsável pelo desenvolvimento e manutenção da vida na Terra e os ecossistemas estão diariamente expostos aos raios solares, os quais são compostos pela luz visível, UV, infravermelho, micro-ondas e ondas de rádio, raios X e raios gama, que compõem o espectro eletromagnético (Diffey, 1991; 2002). A radiação UV foi descoberta no início do século XIX pelo físico Johann Wilhelm Ritter, que identificou em experimentos laboratoriais uma energia invisível ao olho humano a qual denominou inicialmente de raios químicos e posteriormente de UV (Vázquez e Hanslmeier, 2006). Atualmente sabe-

se que a radiação UV representa 7% do espectro solar e possui a capacidade de ionizar moléculas, induzindo a reações químicas (Maverakis *et al.*, 2010). Os efeitos biológicos da radiação UV variam conforme o comprimento de onda, por isso esta radiação é subdividida em três espectros: UV-A (400 – 320 nm), UV-B (320 – 290 nm) e UV-C (290 – 200 nm). O efeito biológico torna-se mais nocivo quanto menor o comprimento de onda e, conseqüentemente, maior a quantidade de energia intrínseca da radiação (Diffey, 2002; Maverakis *et al.*, 2010).

Nos sistemas biológicos, a radiação UV apresenta uma gama de efeitos deletérios, reconhecidos em diferentes grupos animais, de bactérias aos humanos (Tabela 1). A radiação UV pode ser mutagênica, induzir ao agravamento de doenças auto-imunes, de câncer, do foto-envelhecimento e da formação de dímeros de pirimidina ciclobutano – CPD (do inglês, *Cyclobutane pyrimidine dimmers*) . Porém, a radiação UV possui também efeitos benéficos. A radiação UV-A é conhecida por atuar em processos de fotorreparo (Applegate e Ley, 1988; Naganuma *et al.*, 1997; Sinha e Häder, 2002; Dong *et al.*, 2008) e no processo de fotossíntese (Diffey, 1991; Nigel e Gwynn-Jones, 2003), enquanto que a radiação UV-B induz na epiderme uma reação de síntese da vitamina D (Webb e Holick, 1988; Maverakis *et al.*, 2010; Schaumburg *et al.*, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição de alguns dos efeitos biológicos causados pela radiação UV em diferentes organismos:

Radiação UV	Efeitos das radiações UV	Organismos	Referência
UV-C	Esterilizante (lâmpadas germicidas)	Bactérias	Muraca <i>et al.</i> , 1987; Schenk <i>et al.</i> , 2011
	Desinfecção em estações de tratamento de água potável	Cianobactérias e dinoflagelados	Tao <i>et al.</i> , 2010
	Queimadura na pele e inflamação dolorosa na córnea	Humanos	Nigel e Gwynn-Jones, 2003; Maverakis <i>et al.</i> , 2010
UV-B	Danos ao DNA pela produção de fotoprodutos e por reações de fotossensibilização	DNA de bactérias e ouriço do mar	Cadet <i>et al.</i> , 2005; Lesser, 2006; Schuch e Menck, 2010
	Atraso no crescimento devido ao <i>up</i> ou <i>down regulation</i> de genes envolvidos na replicação, processos de reparo do DNA e chaperonas	Zooplâncton	Kim <i>et al.</i> , 2011

	Efeitos negativos na sobrevivência e crescimento	Protozoários marinhos e dulcícolas	Bancroft <i>et al.</i> , 2007
	Alterações morfológicas externas e na pigmentação dos olhos; baixo índice mitótico; estresse oxidativo	Crustáceos	Nazari <i>et al.</i> , 2010
	Efeitos subletais em embriões, larvas e adultos e morte de embriões	Anfíbios	Blaustein e Belden, 2003
	Produção de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e danos a lipídios e proteínas	Peixes e humanos	Sinha e Häder, 2002; Groff <i>et al.</i> , 2010; Maverakis <i>et al.</i> , 2010
	Síntese de vitamina D3	Humanos	Webb e Holick, 1988; Maverakis <i>et al.</i> , 2010; Schaumburg <i>et al.</i> , 2010
UV-A	Produção fotodinâmica de radicais de hidroxila na célula, causando quebras e ligações cruzadas no DNA	DNA de bactérias	Peak e Peak, 1990; Cadet <i>et al.</i> , 2005

Fonte de energia para fotossíntese	Plantas	Diffey, 1991; Nigel e Gwynn-Jones, 2003
Estresse nos componentes dos olhos e hemolinfa	Crustáceos	El-Bakary e Sayed, 2011
Fotorreativação, diminuindo o número de CPD em embriões	Microcrustáceos e peixes	Applegate e Ley, 1988; Naganuma <i>et al.</i> , 1997; Sinha e Häder, 2002; Dong <i>et al.</i> , 2008
Detectada pelos fotorreceptores dos olhos	Invertebrados e vertebrados	Nigel e Gwynn-Jones, 2003
Supressão do sistema imune	Humanos	Damian <i>et al.</i> , 1997
Absorvida por proteínas e cromóforos; estimulação de processos biológicos; fotoenvelhecimento, fotodermatoses e fotocarcinogênese	Humanos	Krutmann, 2000; Nigel e Gwynn-Jones, 2003; Maverakis <i>et al.</i> , 2010

A intensidade da radiação solar UV incidente na superfície terrestre é diretamente influenciada por diversos fatores, como, estações do ano e hora do dia, a cobertura de nuvens, latitudes geográficas, altitude, reflexão em superfícies, aerossóis e gases emitidos decorrentes de queimadas e ozônio estratosférico (Diffey, 1991; Nigel e Gwynn-Jones, 2003; Díaz *et al.*, 2006; McKenzie *et al.*, 2007).

A camada de ozônio, localizada entre 25 e 30 Km acima da superfície terrestre, é resultante de um balanço natural de formação e dissociação da molécula de ozônio (O₃). A radiação UV tem ação fotoquímica sobre a molécula de oxigênio (O₂), dissociando-a em 2 átomos de oxigênio livres (O), cada um desses átomos se ligam a moléculas de O₂ originando 2 moléculas de O₃ (Diffey, 1991). Dentre os espectros da radiação UV, a energia da UV-C é totalmente utilizada na reação fotoquímica, sendo totalmente absorvida pelas moléculas de O₂ e de O₃ e não atingindo a biosfera. A energia da radiação UV-B é parcialmente utilizada na reação fotoquímica, mas a radiação UV-A não é energética suficiente para participar desta reação, sendo esta a mais abundante na superfície (Kirchhoff *et al.*, 2000).

Nos anos 1970, foi descoberto que a camada de ozônio apresenta uma diminuição na concentração de moléculas de O₃ devido à emissão de compostos químicos na atmosfera (Crutzen, 1974; Molina e Rowland, 1974). Destaca-se a emissão dos clorofluorcarbonetos (CFCs), hidrofluorcarbonos (HFCs), perfluorcarbonos (PFCs), bromofluorcarbonos (BFCs) e hexafluoreto de enxofre (SF₆) (Rowland, 2006), além do dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) (Protocolo de Kyoto, 2005; Shanklin, 2010).

A energia da radiação UV também atua em processos fotoquímicos nesses compostos químicos, quebrando-os em moléculas de nitrogênio, hidrogênio, bromo, flúor e cloro, as quais podem se ligar tanto à molécula de O₂ quanto ao átomo de oxigênio, originando novas moléculas, competindo, assim, para a formação do O₃. Naturalmente, estes compostos também ocorrem na estratosfera a partir de fontes como o solo, vapores d'água e oceanos (Kirchhoff *et al.*, 2000).

A formação do buraco na camada de ozônio é o resultado dessas reações e foi descoberto em 1979 sobre a Antártica (Farman *et al.*, 1985). Este fenômeno é sazonal, ocorre durante a primavera e chegou a medir 24 milhões de quilômetros quadrados no ano de 2006 (Leahy, 2006). Durante este fenômeno pode ocorrer uma diminuição de até 80% do O₃ e a radiação pode aumentar mais de 500% (Kirchhoff e Leme, 2006). O quadro atual de mudança atmosférica, principalmente a tendência global de redução no O₃ total, fez surgir na comunidade

científica preocupações quanto ao aumento na intensidade da radiação UV na superfície terrestre (Kirchhoff *et al.*, 2000).

A América do Sul, por estar próxima da Antártica, é uma região de particular interesse de estudos (Díaz *et al.*, 2006). No Brasil foi realizado um estudo mostrando a média mensal dos Índices UV. Em Porto Alegre (RS) o índice UV foi classificado como UV alto ($7 < I-UV < 9$) registrados nos meses de janeiro, fevereiro, março, novembro e dezembro, já em Campo Grande (MS) o índice foi muito alto ($I-UV > 10$) nesse mesmo período (Kirchhoff *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas ocorreram encontros mundiais e assinaturas de protocolos, a fim de evitar ao máximo a utilização do CFCs, como o Protocolo de Montreal em 1987, o de kyoto em 2005 e o de Copenhagen em 2009, mas há uma grande dificuldade em substituir esses gases na indústria e o buraco na camada de ozônio continua aumentando, preocupando cada vez mais a população mundial.

1.2 Efeitos da radiação UV nos ambientes aquáticos

Ecossistemas aquáticos são componentes imprescindíveis da biosfera terrestre, pois produzem mais de 50% da biomassa do nosso planeta e incorporam quantidade igual ou maior de dióxido de carbono atmosférico do que os ecossistemas terrestres (Zepp *et al.*, 2007). A produção primária dos ecossistemas marinhos e dulcícolas constitui a base da cadeia alimentar, provendo energia para os consumidores primários e secundários e contribuindo para a dieta básica humana, na forma de crustáceos, peixes e mamíferos (Häder *et al.*, 2007; Zepp *et al.*, 2007).

Devido ao esgotamento do O₃ estratosférico, existe uma maior incidência na superfície terrestre das radiações UV-A, UV-B e inclusive UV-C (Maverakis *et al.*, 2010) e, por consequência, nos ambientes aquáticos o que gera uma maior exposição dos organismos à radiação UV (Häder *et al.*, 2007). Nestes ambientes a radiação UV pode penetrar até a profundidade de 70 m em águas claras (Smith *et al.*, 1992; Ban *et al.*, 2007).

A penetração da radiação UV nos ambientes aquáticos depende da quantidade de substâncias em suspensão na água, as quais diminuem a sua transparência. De um modo geral, os ambientes de água doce tendem a ser menos claros que os oceanos, onde a radiação pode penetrar mais profundamente. Partículas de matéria inorgânica, carbono orgânico dissolvido – DOC (do inglês, *dissolved organic carbon*) e

carbono orgânico em partículas – POC (do inglês, *particulate organic carbon*) e várias substâncias húmicas contribuem para a atenuação da radiação UV. DOC pode ser degradado em pequenas subunidades na coluna d'água pela radiação UV, sendo que tais subunidades são consumidas pelo bacterioplâncton, de modo a aumentar a transparência da água e, por consequência, aumentar a incidência da radiação UV nestes ambientes. Este aumento na penetração da radiação UV representa uma ameaça à vida dos organismos aquáticos, desde as bactérias até os peixes (Kuwahara *et al.*, 2000; Häder *et al.*, 2003).

1.3 Mecanismos de defesa dos organismos aquáticos

Muitos organismos aquáticos adaptaram mecanismos para prevenir ou reparar danos causados por perturbações ambientais potencialmente prejudiciais, como os induzidos pela radiação UV (Vega e Epel, 2004; Olson e Mitchell, 2006).

Os danos podem ser evitados por compostos fotoprotetores, como carotenóides e os aminoácidos micosporinas – MAA (do inglês, *mycosporine-like amino acids*) que absorvem a radiação UV-A e parte da UV-B, protegendo proteínas, lipídios e DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) contra espécies reativas de oxigênio – ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) e/ou impedindo a peroxidação lipídica (Dahms e Song-lee, 2010).

Outro mecanismo de defesa é constituído pelo cromatóforos, que são células presentes na superfície corporal, as quais apresentam pigmentos que absorvem e degradam a radiação em diferentes comprimentos de ondas. Grandes cromatóforos estão localizados normalmente próximos a órgãos vitais e, em condições de luminosidade, podem expandir seu pigmento, de forma a recobrir uma maior área corporal (Miner *et al.*, 2000, Gouveia *et al.*, 2004).

Além destes mecanismos, os organismos também dispõem de proteínas de choque térmico – Hsp (do inglês, *Heat shock protein*) que são responsáveis pela homeostase das proteínas (Vega e Epel, 2004; Kim *et al.*, 2011). Todos os organismos possuem genes Hsp que codificam proteínas, as quais variam no seu padrão de expressão, podendo ser constitutivas ou induzíveis por estresse. Durante um estresse intenso, inclusive o da radiação UV, as Hsps induzíveis atuam em diferentes funções celulares, como: evitam a desnaturação das proteínas mantendo o seu padrão de dobramento; auxiliam na localização das organelas para a translocação proteica; minimizam a

agregação de proteínas não nativas; e reconhecem as proteínas não nativas ou agregadas, a fim de direcioná-las à degradação ou remoção (Feder e Hofmann, 1999; Blaustein e Belden, 2003; Dang *et al.*, 2010). Exemplos da atividade de Hsp foram encontrados em camarões marinhos em condições de hipóxia (Feder e Hofmann, 1999) e nos camarões de água doce em tecidos expostos ao aumento de temperatura (Selvakumar e Geraldine, 2005).

A radiação UV tem como alvo celular principalmente o DNA e as proteínas, que podem absorver esta radiação e ser quimicamente alteradas por ela (Diffey, 1991). A formação de CPDs e (6-4) fotoprodutos – (6-4) PP (do inglês, *(6-4) photoproducts*) induzidos pela UV, são resultados diretos da absorção dos fótons pelas bases do DNA (Schuch e Menck, 2010). A formação destes dímeros inibe a transcrição e tradução, o que pode levar ao acúmulo de mutações genéticas e à morte celular (Maverakis *et al.*, 2010). Existem duas vias principais de reparo de DNA observadas para danos os induzidos pela radiação UV: reparo por excisão de nucleotídeo – NER (do inglês, *nucleotide excision repair*) e fotorreativação enzimática (Malloy *et al.*, 1997; Häder e Sinha, 2005)

NER é um mecanismo mais complexo, envolve múltiplas proteínas e requer energia metabólica sob a forma de adenosina trifosfato – ATP (do inglês, *Adenosine triphosphate*), encontrado em todos os organismos (Sinha e Häder, 2002). O processo desta via de reparo inicia com o reconhecimento do dano, a excisão desse erro pela enzima endionuclease e a subsequente ressíntese da fita de DNA reparada (Malloy *et al.*, 1997; Toussaint *et al.*, 2010; Dahms e Song-Lee, 2010) (figura 1).

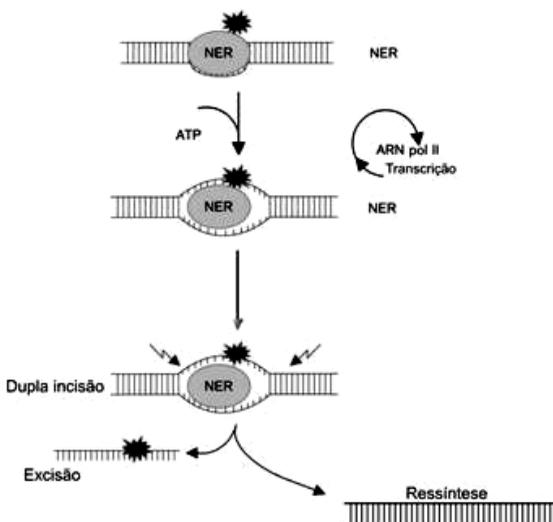


Figura 1: Via de reparo do DNA por excisão de nucleotídeo. Esta via de reparo utiliza ATP durante o processo de recuperação do DNA. Adaptado de <http://cienciadiaria.com.br>.

A fotorreativação é uma via dependente da luz visível descrita inicialmente por Kelner (1949). Estão envolvidas na fotorreativação, além da energia fotorreparadora da luz visível – PRR (do inglês, *photorepair radiation*) (Naganuma *et al.*, 1997; Lacuna e Uye, 2000), a energia da radiação UV-A (Applegate e Ley, 1988; Sinha e Häder, 2002; Dong *et al.*, 2007; 2008). A fotorreativação depende da atividade da enzima fotoliase, que usa a energia da radiação PRR ou UV-A; a atividade da fotoliase foi detectada em procariotas e eucariotas, mas não nos humanos (Vega e Epel, 2004) e a fotorreativação foi encontrada em membros de todos os reinos (Sinha e Häder, 2002; Dahms e Song-lee, 2010).

A fotorreativação parece ser importante para os organismos aquáticos expostos à radiação UV-B, pois pode reparar danos ao DNA com menos gasto energético (Boesch *et al.*, 2011). A fotoliase liga-se ao CPD no escuro e se esse complexo for exposto à PRR, essa energia é absorvida e uma segunda enzima é ativada para separar a ligação do CPD e reparar o DNA (Diffey, 1991; Blaustein e Belden, 2003, Häder e Sinha, 2005) (figura 2).

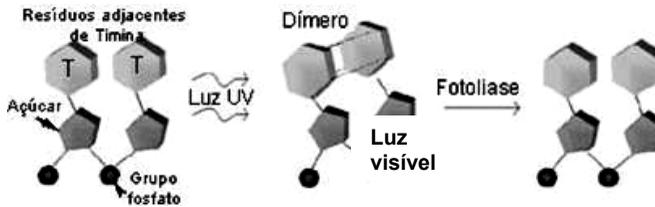


Figura 2: Via de reparo do DNA por fotorreativação. Utilizando a energia da luz UV ou da luz visível, a enzima fotoliase recupera o DNA. Adaptado de <http://www.biorede.pt>.

A taxa de fotorreativação difere muito entre os eucariótas e ainda, entre as fases do ciclo de vida. Observa-se que os adultos são mais tolerantes ao UV do que os juvenis e os embriões e que a capacidade de fotorreativação diminui com a idade (Lacuna e Uye, 2001; Dong *et al.*, 2008). Porém, se o dano celular está além da capacidade de reparação do organismo, a célula é induzida à apoptose (Vega e Epel, 2004).

A apoptose (morte celular programada) é um processo fisiológico fundamental para o desenvolvimento dos seres vivos e à manutenção da homeostase dos tecidos, sendo importante para eliminar células defeituosas ou células produzidas em excesso, bem como células com danos celulares induzidos por agentes genotóxicos (Alberts *et al.*, 2010). Os componentes celulares chave para que a apoptose ocorra, são a proteína Bcl2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*), o composto Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor 1*) e os membros da família das caspases (do inglês, *cysteine-aspartic-acid-proteases*) (Desagher e Martinou, 2000). A apoptose ocorre em uma sequência organizada de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados, podendo ser iniciada por duas vias: uma de sinalização extrínseca, mediada por receptores e outra de sinalização intrínseca, mediada pela mitocôndria. Ambas as vias estão associadas à atividade proteolítica e/ou nucleolítica (Li *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1999; Wang, 2001).

A via extrínseca (citoplasmática) é iniciada pela ligação de um receptor da família dos receptores de morte com o seu respectivo ligante extracelular, levando à formação de um complexo ligante-receptor, que recruta mais fatores citosólicos, como a proteína adaptadora FADD (do inglês, *FAS-associated death domain*) e caspases ativadoras, formando um complexo de sinalização/indução de morte – DISC (do inglês, *death inducing signalling complex*) (Muzio, *et al.*, 1996). Este complexo, ativa

as caspases efetoras que clivam as proteínas, levando à condensação e fragmentação nuclear, e externalização de fosfolipídios de membrana, que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos. A via extrínseca pode interagir com a via intrínseca através da mediação da caspase ativadora, clivando a proteína Bid (do inglês, *BH3 interacting domain death agonist*) (Gross *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 1998), que induz as proteínas Bax (do inglês, *Bcl-2-associated X protein*) e/ou Bak (do inglês, *Bcl-2 homologous antagonist/killer*) à formar canais na membrana mitocondrial (Wang, 2001) (figura 3).

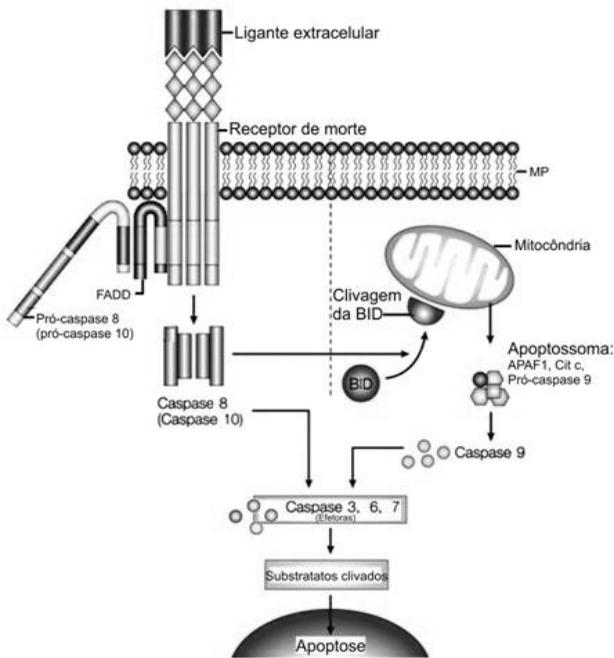


Figura 3: Via apoptótica extrínseca e interação desta via com a via intrínseca. A Via apoptótica extrínseca é ativada por um ligante extracelular ao receptor de morte localizado na membrana celular. No citoplasma são recrutados a proteína adaptadora FADD e a pró-caspase 8, formando o complexo DISC. A caspase 8 ativa as caspases efetoras que irão clivar as proteínas. A caspase 8 pode interagir com a via intrínseca através da mediação com as proteínas da família Bcl2, as quais agem na membrana mitocondrial (Adaptado de Igney e Krammer, 2002).

A via intrínseca (mitocondrial) é mediada por sinais de morte, como estresse oxidativo e dano ao DNA que atuam diretamente ou indiretamente na mitocôndria. Esta organela, em resposta a esses estímulos apoptóticos, libera os fatores apoptóticos de seu espaço intermembranoso para o citosol (Wang, 2001), como o citocromo *c*, que se associa ao Apaf-1 e, na presença de ATP, se associa às caspases ativadoras, formando um complexo protéico denominado apoptossoma, que cliva e ativa as caspases efetoras (Li *et al.*, 1997) (figura 4).

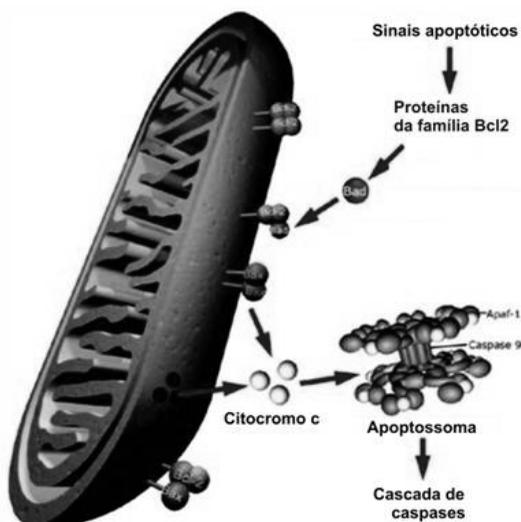


Figura 4: Via intrínseca apoptótica. Sinais apoptóticos, através das proteínas da família Bcl2, ativam a via intrínseca mitocondrial. Em resposta a esses estímulos, a mitocôndria libera o citocromo *c* presente no citosol, o qual se associa ao Apaf-1 e às caspases ativadoras, formando o apoptossoma. Esse complexo protéico irá ativar a cascata de caspases (Adaptado de *Website by Dash*, 2011).

A radiação UV pode apresentar ainda efeitos indiretos ou subletais que podem ser investigados pela expressão de algumas proteínas, como a histona H3, importante em processos celulares como a transcrição, a mitose e a meiose. A histona H3 está associada ao DNA, juntamente com outras três histonas, e durante a divisão celular ela é fosforilada, auxiliando a compactação do cromossomo; este é um evento altamente conservado nos eucariotas (Hendzel *et al.*, 1997; Van Hooser

et al., 1998; Wei *et al.*, 1998; 1999; Workman e Kingston; 1998). Um anticorpo específico contra histona H3 fosforilada - PHH3 (do inglês, *phospho-Histone H3*) foi desenvolvido e utilizado em diversos trabalhos (Van Hooser *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1998, 1999; Schmitt *et al.*, 2002; Nazari *et al.*, 2010), sendo considerado um dos melhores marcadores mitóticos (Hendzel *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 2002).

Além da proliferação celular, pode-se também investigar a expressão das proteínas envolvidas no estresse celular, como as Hsp70, que pertencem à família das Hsps induzíveis por estresse. O gene Hsp é altamente preservado entre as espécies, por isso tem sido sugerida a utilização dessa proteína como biomarcador de estresse ambiental (Hamer *et al.*, 2004; Sanders e Martin, 1993).

A família de proteínas Bcl2 inclui tanto proteínas anti-apoptóticas como pró-apoptóticas. Essas proteínas possuem até quatro domínios Bcl2 (BH) homólogos conservados (BH1, BH2, BH3 e BH4) essenciais para a interação e função destas proteínas (Gross *et al.*, 1999). A maioria dos membros da família Bcl2 possui um domínio transmembranar no terminal COOH, o qual é importante para o seu direcionamento para as membranas intracelulares. Proteínas pró e anti-apoptóticas podem ser encontradas no citosol, retículo endoplasmático (RE), mitocôndria e envelope nuclear (Chen-Leavy e Cleary, 1990; Lithgow *et al.*, 1994; Zong *et al.*, 2003; Gajkowska *et al.*, 2004).

A proteína Bcl2 tem função anti-apoptótica e assim como a Bcl-x_L (do inglês, *B cell lymphoma xL*), agem inibindo membros pró-apoptóticos da família Bcl2 através da heterodimerização pelos domínios BH, seqüestro dos membros pró-apoptóticos ou competindo por sítios na membrana externa mitocondrial que seriam ocupados pelos membros pró-apoptóticos (Lithgow *et al.*, 1994; Merry e Korsmeyer, 1997; Cory e Adams, 2002).

As proteínas Bak, Bax, Bad (do inglês, *BCL2-antagonist of cell death*), Bim (do inglês, *Bcl-2-L11*) e Bid têm função pró-apoptóticas, apresentam multidomínios BH e durante a apoptose formam grandes homoligômeros e medeiam a permeabilização da membrana externa mitocondrial às proteínas. Bax é uma proteína citosólica que durante a apoptose muda sua conformação e integra-se no interior da membrana externa mitocondrial, enquanto que Bak, Bax e Bid são encontradas no RE, envelope nuclear e membrana mitocondrial (Wei *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2003; Gajkowska *et al.*, 2004). Bak é uma proteína integral da membrana (Wei *et al.*, 2000; Leu *et al.*, 2004) e para a sua ativação, assim como para Bax, são descritas duas vias, a ligação da proteína Bid em seu domínio, ativando diretamente as proteínas Bak ou Bax quando

ocorre o estímulo apoptótico, e a via por Bad que ocupa o domínio de membros anti-apoptóticos Bcl2, ativando Bak ou Bax, promovendo a formação de um canal na membrana mitocondrial e a liberação de fatores apoptóticos (Letai *et al.*, 2002).

As caspases são proteínas da família das proteases cisteínicas. Cada caspase é sintetizada como uma pró-enzima que requer um processamento de clivagem para gerar a proteína ativa. As caspases que participam da apoptose são as caspase 8 e caspase 9, que apresentam função ativadora por clivarem as caspases efetoras inativas, as caspase 3 e caspase 7 (Nicholson e Thornberry, 1997; Boatright e Salvesen, 2003). As caspases podem ser ativadas pelas duas vias apoptóticas. A via intrínseca, através da ativação da caspase 9 pelo Apaf-1 e a via extrínseca, onde os receptor de morte de membrana plasmática recrutam a caspase 8 através da FADD (Li *et al.*, 1997; 1998; Cryns e Yuan, 1998; Wang, 2001).

A família das proteínas p53 é necessária para o funcionamento normal da célula durante o desenvolvimento, integrando informações e determinando escolhas celulares entre proliferação, diferenciação, migração e morte celular, mecanismos importantes para o balanço da sobrevivência e morte celular (Danilova *et al.*, 2008). A proteína p53 regula a resposta celular a estressores ambientais ou intracelulares regulando a apoptose, a parada do ciclo celular, a senescência, o reparo do DNA e a estabilidade genética (Evan e Littlewood, 1998; Lesser *et al.*, 2001). Esta proteína é um dos sensores celulares de danos ao DNA, como os induzidos pela radiação UV, que são capazes de super-expressar a p53 e ativar a via apoptótica (Lesser *et al.*, 2001; Miguel *et al.*, 2007). O estresse induz a translocação da p53 do núcleo para a mitocôndria, onde neutraliza o efeito de inibição das proteínas Bcl-xL e Bcl2 sob as proteínas pró-apoptóticas Bid, Bax e Bak. Esta inibição permite que os fatores apoptogênicos, como citocromo *c* ou Smac/DIABLO, sejam liberados da membrana interna mitocondrial para o citosol e ativem as caspases (Schuler e Green, 2001; Leu *et al.*, 2004) (figura 5).

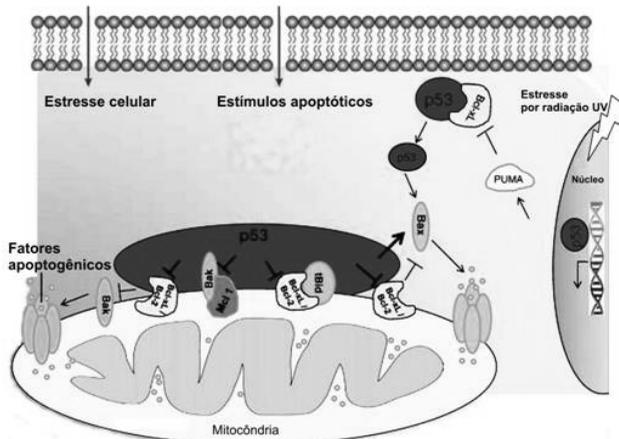


Figura 5: Interação da proteína p53 com as proteínas da família Bcl2. Estressores ambientais ou intracelulares estimulam a super-expressão da proteína p53 e ativam a via apoptótica. A p53 se transloca do núcleo para a mitocôndria, onde neutraliza o efeito de inibição das proteínas anti-apoptóticas sob as proteínas pró-apoptóticas, assim, os fatores apoptogênicos são liberados da membrana mitocondrial e ativem as caspases (Adaptado de Vaseva e Moll, 2009).

1.4 Efeitos da radiação UV nos organismos aquáticos

Para avaliar os efeitos da radiação UV nos organismos e em linhagens celulares, os pesquisadores utilizam diversos modelos animais. Os estudos com organismos aquáticos enfocam principalmente análises morfológicas e sobrevivência, desde gametas ao indivíduo adulto. Nesses estudos observou-se atraso na eclosão e no crescimento dos embriões, malformação e menor taxa de sobrevivência das larvas de microcrustáceos, poliquetas e peixes (Lacuna e Uye, 2000; Dong *et al.*, 2008; Bancroft *et al.*, 2007; Ban *et al.*, 2007; Nahon *et al.*, 2011). Outros estudos observaram um aumento de estresse oxidativo em zebrafish e crustáceos (Charron *et al.*, 2000; Nazari *et al.*, 2010) e ainda, testes de danos ao DNA, como a quantificação de fotoprodutos de CPD e (6-4) PP foram aplicados em bactérias marinhas e peixes, os quais indicaram que a radiação UV induz a formação desses fotoprodutos (Olson e Mitchell, 2006; Matallana-Surget *et al.*, 2010). O teste de micronúcleo, um biomarcador de genotoxicidade dos agentes que causam fragmentação dos cromossomos em peixes e répteis, também

demonstrou efeitos danosos ao DNA causados pela radiação UV (Groff *et al.*, 2010; Schaumburg *et al.*, 2010).

Grande parte das pesquisas concentra seus estudos em adultos, larvas ou embriões de microcrustáceos e peixes, no entanto, poucos são os estudos com os macrocrustáceos, um grupo biologicamente diverso e amplamente distribuído geograficamente, importante para a dinâmica dos ambientes aquáticos e para a economia. A Ordem Decapoda abrange crustáceos importantes em todo o mundo, como lagostas, caranguejos e camarões (VanHook e Patel, 2008), utilizados na pescaria artesanal, comercial e recreacional, colhidos em seu habitat selvagem ou cultivados, além de fazerem parte da cadeia alimentar como presas para a maioria dos organismos, no seu estágio larval ou adulto (Teixeira e Sá, 1998).

O gênero *Macrobrachium* inclui espécies de camarões de água doce, como *M. acanthurus*, *M. potiuna* e *M. olfersi*, os conhecidos pitus, que vivem desde a Flórida até a região sul da América do Sul (Holthuis, 1980), em águas rasas, onde a radiação UV penetra facilmente e tem sua incidência aumentada a cada ano (André *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2006), podendo afetar, assim, a dinâmica populacional dessas espécies.

A espécie *M. olfersi* possui o desenvolvimento embrionário de 14 dias, em condições de 24°C (Müller *et al.*, 2003; Simões-Costa *et al.*, 2005), seus ovos são ricos em vitelo (centrolécitos) e possuem cório transparente e resistente. A clivagem é do tipo meroblástica superficial, onde o embrião, formado por células transparentes, arranja-se na periferia do ovo e mantém essa posição nos estágios subsequentes. Essas características embrionárias permitem uma visualização direta das mudanças morfológicas nos diferentes estágios da embriogênese ao longo do tempo de incubação (Nazari *et al.*, 2003), o que o torna um bom modelo animal (Müller *et al.*, 2003) para os estudos relativos à ação da radiação UV no desenvolvimento embrionário de invertebrados (Nazari *et al.*, 2010).

Os crustáceos têm sido utilizados em estudos de fisiologia, neurobiologia e anatomia e nos dias atuais é comum vê-los em pesquisas nas áreas de biologia do desenvolvimento, biologia celular e molecular (VanHook e Patel, 2008; Nazari *et al.*, 2010; El-Bakary e Sayed, 2011).

Nos estudos sobre os efeitos da radiação UV ressaltam-se a utilização de espécies de crustáceos em pesquisas sobre a dispersão de pigmentos nos cromatóforos, em exemplares adultos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* e do camarão *Palaemonetes argentinus* (Gouveia *et al.*, 2004), no estudo do sistema visual de adultos do caranguejo *Ucides cordatus* (Miguel *et al.*, 2002) e em larvas dos

caranguejos *Cancer oregonensis* e *Telmessus cheiragonus* (Miner *et al.*, 2000). Em particular na espécie de camarões *M. olfersi*, foco da presente dissertação, foram identificados efeitos da radiação UV na morfologia externa, índice mitótico e estresse celular de embriões (Nazari *et al.*, 2010).

1.5 Justificativa

Atualmente, os reconhecidos efeitos nocivos da radiação UV preocupa cada vez mais os pesquisadores, pois ela atinge todos os ambientes, podendo interferir na cadeia alimentar e na dinâmica das populações, alterando, assim, os ecossistemas. Apesar dessa problemática ambiental estar sendo estudada desde a descoberta do buraco na camada de ozônio sobre a Antártica (1979), ainda pouco se sabe sobre as respostas biológicas dos organismos aquáticos, bem como os mecanismos de defesa que esses animais apresentam contra os efeitos da radiação UV. Muitos animais aquáticos possuem seu período reprodutivo durante os meses de verão, quando os índices de radiação UV são mais intensos, e ainda, esses animais apresentam diferentes estágios em seu ciclo de vida, estando expostos à radiação UV durante toda sua existência. Estudos confirmam que a fase embrionária é a mais susceptível aos efeitos nocivos da radiação UV (Naganuma *et al.*, 1997; Charron *et al.*, 2000; Bonaventura *et al.*, 2006; Bancroft *et al.*, 2007), portanto pesquisas voltadas para o reconhecimento dos mecanismos celulares desses embriões seriam de grande relevância. Este trabalho procurou identificar alguns desses mecanismos de resposta à radiação UV, utilizando embriões de camarão de água doce *M. olfersi* como modelo para o estudo. Foram avaliados os efeitos morfológicos externos e moleculares durante todo o desenvolvimento desses embriões expostos às radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A. Além disso, foi proposto a análise da atividade da radiação UV-A no processo de fotorreativação celular em embriões previamente expostos às radiações UV-A e UV-B isoladamente.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos das radiações UV-A e UV-B sobre os embriões do camarão de água doce *M. olfersi* em diferentes idades do desenvolvimento, bem como investigar o potencial da radiação UV-A nos processos de fotorreativação.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade, o ritmo do desenvolvimento e a ocorrência de alterações morfológicas externas dos embriões submetidos aos procedimentos de irradiação com UV-A e UV-B separadamente e irradiação com UV-B seguido de UV-A;
- Caracterizar o processo da proliferação celular, por meio de imunomarcações, em em embriões de *M. olfersi* em diferentes idades do desenvolvimento, submetidos aos procedimentos de irradiação com UV-A e UV-B separadamente e irradiação com UV-B seguido de UV-A;
- Verificar a ocorrência de apoptose nos embriões submetidos aos diferentes procedimentos de irradiação e buscar reconhecer através de imunomarcações, as prováveis vias apoptóticas ativadas;
- Investigar a ocorrência de danos induzidos no citoplasma e no DNA das células dos embriões de *M. olfersi* expostos aos diferentes procedimentos de irradiação.

3. Materiais e Métodos

3.1 Modelo Animal: Foram utilizados para este estudo embriões de camarão de água doce da espécie *M. olfersi*. Esses animais, assim como outros decápodes, são bons bioindicadores de contaminação aquática (Rinderhagen *et al.*, 2000), fáceis de manipular e de manter em laboratório. As fêmeas apresentam em média 46,7 mm de comprimento corporal e fecundidade média de 1917,2 ovos, os quais são transportados em uma câmara incubadora ventral, até a eclosão, permitindo a obtenção dos embriões para estudos experimentais (Nazari *et al.*, 2003).

3.2 Captura dos animais: Os camarões adultos de *M. olfersi* foram capturados no Parque Municipal da Lagoa do Peri (Autorização nº 15294-1/IBAMA/2008), localizado na região sudeste da Ilha de Santa Catarina. O Parque está inserido em um dos últimos remanescentes de Floresta Atlântica e abriga a maior lagoa de água doce da costa catarinense, com profundidade máxima de 11 metros e está a 3 metros acima do nível do mar, portanto não é afetada pelas oscilações da maré. A Lagoa do Peri é o maior habitat da Ilha para espécies de água doce, um ambiente de águas claras e sem contaminações, usada para o abastecimento de água potável de parte da população (CECA/FNMA, 1996). Os animais habitam preferencialmente as margens rasas da lagoa, estando expostos à mesma intensidade de radiação UV da superfície, que corresponde a uma média de 288 mWcm^{-2} , baseado no índice diário de UV fornecido pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) durante os meses de dezembro à março, mesma época de reprodução dos camarões *M. olfersi*.

3.3 Aclimação e reprodução dos animais em aquário: Os animais coletados foram transportados até o laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal BEG/CCB/UFSC em aquários portáteis com aeração constante (figura 6a). No laboratório, os animais foram aclimatados em aquários de 30 litros, contendo água da declorificada e com sedimento arenoso e pedras para abrigo, por um período de 48 horas (figura 6b). A espécie *M. olfersi* foi identificada segundo Holthuis (1980) e os exemplares sexados de acordo com a presença de caracteres

sexuais secundários, como a presença do apêndice masculino e da câmara incubadora feminina.

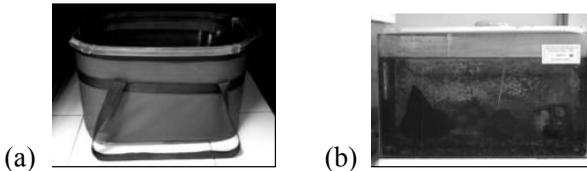


Figura 6: Aquário portátil de transporte dos camarões (a) e aquário de 30 L para aclimatização.

Para favorecer a cópula e postura de ovos em laboratório, machos e fêmeas na proporção 1:3 foram acondicionados em aquário de 60 litros, em uma densidade de estocagem de 4 animais/litro. Os animais foram mantidos à temperatura de 24°C (± 1), fotoperíodo natural e alimentação em dias alternados com a ração comercial Alcon Bottom Fish® para organismos aquáticos.

O estagiamento dos embriões foi realizado *in vivo* ao estereomicroscópio (Olympus SHZ 10; zoom de 35 – 70 X) utilizando a metodologia que classifica o desenvolvimento por dia embrionário (E) (Müller *et al.*, 2003; Simões-Costa *et al.*, 2005).

Visando a otimização dos experimentos, os embriões foram agrupados em três idades, levando em consideração a formação do olho, conforme os dias embrionários (Quadro 1).

Quadro 1: Organização das idades com base nas características do desenvolvimento do olho.

Idades	Dia embrionário	Característica
1	E1 – E6	Ausência do olho
2	E7 – E9	Início da pigmentação do olho
3	E10 – E14	Olho composto por omatídeos

3.4 Grupos experimentais: Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, para avaliar os efeitos isolados das radiações UV-A e UV-B, assim como a interação destas duas radiações (Quadro 2).

Quadro 2: Definição dos grupos experimentais adotados no presente estudo.

Grupo	Radiação UV	Procedimento	Objetivo
Grupo I (n = 30)	UV-B	Exposição à radiação UV-B por 30 minutos	Verificar o efeito isolado da radiação UV-B
Grupo II (n = 62)	UV-A	Exposição à radiação UV-A por 60 minutos	Verificar o efeito isolado da radiação UV-A
Grupo III (n = 16)	UV-B+UV-A	Exposição à radiação UV-B por 30 minutos e imediatamente exposição à radiação UV-A por 60 minutos	Verificar o efeito fotorreparador da radiação UV-A sobre os efeitos da UV-B
Grupo IV (n = 23)	Não irradiado	---	Fêmeas utilizadas como controle

n = número de fêmeas utilizadas para cada grupo. O número de fêmeas variou entre os grupos, em função da necessidade de padronização das técnicas utilizadas neste trabalho.

3.5 Procedimento de irradiação: Para a irradiação artificial, as fêmeas ovígeras (figura 7) foram transferidas para o aquário de 30 litros, com fundo desprovido de areia e abrigos, mantido em uma câmara escura, a qual sustenta lâmpadas distintas UV-B de 6 W e UV-A 6 W (Vilber – Lourmat). A irradiância foi obtida pelo radiômetro International Light IL1400A, sendo utilizada para UV-B 310 mW/cm² e para UV-A, 0,94 mW/cm². A dose irradiada foi calculada através da fórmula $D = (t.60.I)/1000$, onde t = tempo em minutos e I = irradiância (Diffey, 2002). Após a irradiação, as fêmeas foram mantidas em aquário escuro por quatro dias, evitando a ocorrência de fotorreparo pela

radiação UV-A e luz visível e permitindo que o desenvolvimento prossiga.



Figura 7: Fêmea adulta ovígera do camarão *M. olfersi*. O asterisco localiza a região externa na fêmea onde são carregados os ovos, chamada de camara incubadora abdominal. Os embriões estão expostos as mesmas condições de radiação que a fêmea.

3.6 Análise da morfologia externa dos embriões e do ritmo do desenvolvimento: As características morfológicas externas dos embriões foram observadas e registradas antes dos embriões serem irradiados e após quatro dias da irradiação. Foram verificadas as seguintes características morfológicas: (1) forma do embrião e tamanho do ovo; (2) textura do vitelo; (3) pigmentação do embrião e do olho; (4) transparência das células embrionárias; (5) crescimento da papila caudal e dos apêndices naupliares e pós-naupliares; (6) cromatóforos (Müller *et al.*, 2004). As alterações observadas nestas características foram categorizadas e quantificadas.

O ritmo do desenvolvimento foi avaliado através das análises das características morfológicas externas esperadas para o dia embrionário analisado (Müller *et al.*, 2007).

3.7 Determinação do volume dos ovos e índice do olho dos embriões: Uma amostra ($n = 5$ ovos) retirada de cada fêmea ovígera foi analisada ao microscópio de luz (Olympus), utilizando a ocular micrométrica (40X) para a obtenção das medidas dos eixos longitudinal (L) e transversal (T), e cálculo do volume do ovo através da fórmula $(\pi.L.T^2)/6$ (Odinetz-Collart e Rabelo, 1996).

Para os embriões das idades 2 e 3 foram obtidas as medidas do eixo longo (l) e curto (h) do olho para calcular o índice do olho, utilizando a fórmula $(l+h)/2$ (Perkins, 1972). Os valores obtidos para ambas as medidas foram expressos em milímetros cúbicos.

3.8 Determinação da massa fresca e seca dos ovos: uma amostra de ovos (n = 50) foi retirada das fêmeas ovígeras para a obtenção da massa fresca (mf) em balança de precisão (0,1 g), estes mesmos ovos foram colocados na estufa (70° C) por 48 horas e pesados novamente, para obtenção da massa seca (ms). A porcentagem de água dos ovos foi calculada através da fórmula $(mf-ms)100/mf$.

3.9 Preparo dos embriões para as análises microscópicas: a descorionização dos ovos foi realizada com hipoclorito de sódio 5%, por cerca de 10 minutos, seguida por 3 lavagens na solução de 0,7% NaCl 1,5 M e 0,04% triton X-100 (Araujo e Bier, 2000). Logo após esse procedimento, os ovos foram fixados por 10 minutos na solução fixadora contendo tampão fosfato salino – PBS (do inglês *phosphate buffer saline*) 10 mM, EGTA (do inglês, *ethylene glycol tetraacetic acid*) 0,05 M, formaldeído 37%, heptano PA (Hemavathy *et al.*,1997; Araújo e Bier, 2000) à temperatura ambiente, em seguida os ovos foram colocados no metanol PA por 30 segundos e conservados em etanol PA à temperatura de 4° C.

Para a inclusão, os ovos já desidratados foram diafanizados com xilol PA e incluídos em Paraplast®. Foram confeccionadas lâminas com cortes seriados, seccionados no micrótomo rotativo (6 µm); em cada lâmina foram colocadas, de forma organizada, amostras de cada um dos quatros grupos experimentais, visando uniformizar as condições técnicas durante a coloração e as imuno-histoquímicas, como representado na figura 8:

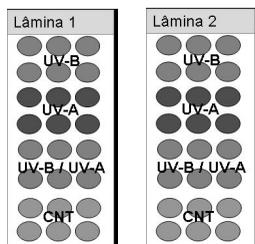


Figura 8: Exemplo de uma série de lâminas confeccionadas com os cortes das amostras incluídas em Paraplast®.

Em cada série de lâminas confeccionadas, uma foi destinada à coloração com hematoxilina e eosina (HE), como controle histológico antes da realização da imuno-histoquímica. Para isso, as lâminas foram desparafinizadas com xilol, reidratadas numa série etanólica decrescente

(100 – 70%), imersas na hematoxilina e na eosina, para observação ao microscópio de luz (Beçak e Paulete, 1976).

3.10 Marcações celulares por imuno-histoquímicas: Para a identificação das alterações celulares e moleculares desencadeadas pelas radiações UV-B, UV-A e UV-B+UV-A foram utilizados anticorpos primários para a marcação de células apoptóticas, células em proliferação, estresse celular e nuclear (Quadro 3).

Quadro 3: Características dos anticorpos primários utilizados nas marcações celulares por imunohistoquímica.

Efeitos da Radiação UV	Especificidade	Anticorpo	Espécie de origem	Espécie desenvolvida	Local de ligação
Gerais	Apoptose	anti-Bak	Humana	Rato policlonal	núcleo/citoplasma
		anti-Bcl-2	Peptídeo sintético (humana)	Rato monoclonal	núcleo
		anti-caspase 8	Humana	Rato monoclonal	citoplasma
		anti-caspase 3	Humana	Coelho policlonal	núcleo/citoplasma
	Proliferação celular	anti-fosfo-histona H3	Humana	Coelho policlonal	núcleo
	Ciclo celular	anti-p53	Humana	Rato policlonal	núcleo/citoplasma
	Estresse celular	anti-Hsp 70 induzível	Humana	Rato monoclonal	citoplasma
Específico	Danos ao DNA	anti-dímero de timina	Rato	Rato monoclonal	núcleo

Todos os anticorpos primários utilizados possuem isotipos IgG. Fonte: Informações dos anticorpos cedidas pelos fornecedores.

As lâminas foram destinadas à imuno-histoquímica em microscopia de luz, fluorescência e confocal. Para os procedimentos de incubação com os anticorpos primários, os cortes foram desparafinizados com xilol, reidratados em uma série etanólica decrescente, lavados com PBS a 0,1M, incubados com 3% de peróxido de hidrogênio e metanol (1:1) para inativar as peroxidases endógenas, lavadas com PBS 0,1M + 0,3% Triton X-100 para permeabilizar membranas, e incubados por 30 minutos em 5% albumina sérica bovina BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) (Gibco®), para bloquear ligações não-específicas nas imunoglobulinas das células. Depois dessas etapas, os cortes foram incubados com um dos anticorpos primário, em uma câmara úmida à 4° C durante a noite.

Para a ligação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, os cortes foram lavados com PBS 0,1M + 0,3% Triton X-100 e incubados com o anticorpo secundário por 3 horas à temperatura ambiente, em uma câmara úmida. Os cortes foram lavados novamente com PBS 0,1M, seguido por lavagem com PBS 0,1M + 0,1% Triton X-100 e novamente com PBS 0,1M. A marcação foi revelada com a ação do DAB (3,3' diaminobenzidina, Sigma), que degrada a peroxidase conjugada no anticorpo secundário, gerando uma cor marrom no lugar da ligação dos anticorpos. Os cortes foram desidratados em uma série etanólica crescente (70 – 100%) e montados com Entellan® (Merck).

Para os anticorpos anti-caspase 8, anti-Bcl-2, anti-Hsp 70 e anti-p53 foi utilizado anticorpo secundário conjugado com biotina, o qual requer a incubação com a proteína streptavidina (ExtraAvidin®-Peroxidase, Sigma) por 40 minutos, antes da revelação com DAB.

Para os anticorpos anti-Bak e anti-dímeros de pirimidina o anticorpo secundário utilizado foi o conjugado com fluorocromo laranja Alexa Fluor 568 ou vermelho Alexa Fluor 633 (Invitrogen®) e incubados com a sonda nuclear fluorescente DAPI (4,6-diamidina-2-fenilindol, Sigma®) por 3 minutos ou com o fluorocromo Hoescht (Bisbenzimidazole HOE33258, trihydrochloride, Calbiochem®) por 10 minutos. Para a montagem da lâmina foi utilizado Gelmount® (Biomedica). As marcações celulares foram observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX41 epifluorescente, filtro triplo ou vermelho) ou microscópio confocal (Leica DMI6000 B).

Os controles negativos destas técnicas foram feitos suprimindo-se a incubação com os anticorpos primários, os quais foram substituídos por PBS.

3.11 Análises dos resultados: Para a avaliação quantitativa das células marcadas por imuno-histoquímica de luz, a contagem foi realizada através do método estereológico utilizando a graticula de Weibel (Freere e Weibel, 1967). Ao todo, foram contadas as células reativas de 10 embriões de cada grupo experimental, em triplicadas. O cálculo da densidade numérica de células marcadas por área (NA) foi realizado utilizando a fórmula (n° de células reativas) / (36,36 x 0,0004). Nas marcações celulares por imuno-histoquímica de fluorescência, os cortes histológicos foram fotografados no aumento de 1000x, utilizando o sistema de captura de imagens digital colorida (3.3 mpxel, QColor 3C da Q-imaging) integrado ao microscópio (Olympus BX41) e o programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging. Para a quantificação das marcações, foi empregado o método de contagem direta dos núcleos marcados por DAPI ou Hoescht para o cálculo da porcentagem média das marcações.

3.12 Análises estatísticas: Os resultados quantitativos das análises morfométricas e estereológicas foram analisados no programa estatístico Statistica® 6.0. As diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais foram verificadas utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste post-hoc de Tukey, com nível de significância $p \leq 0,05$. Para verificar a interação entre UV-A e UV-B, foi utilizada ANOVA de duas vias.

Os procedimentos adotados neste projeto foram aprovados no Departamento BEG/CCB através do projeto de pesquisa, protocolo n° 2010.0029/UFSC.

4. Resultados

4.1 Análises biométricas dos ovos e embriões

Para avaliar o efeito da radiação UV nos ovos dos embriões de *M. olfersi* nas idades 1, 2 e 3, analisou-se o volume e a porcentagem de água presente nos ovos e o índice do olho dos embriões. Para estas análises foram utilizados em média 97 ovos para o grupo controle (CNT); 239 ovos para o grupo UV-A; 99 ovos para o grupo UV-B; 68 ovos para o grupo UV-B+UV-A.

Ao longo do desenvolvimento o volume dos ovos tende a aumentar, o que foi observado no grupo controle nas três idades embrionárias analisadas. Os grupos irradiados na idade 1 diferiram do grupo controle, apresentando um aumento significativo do volume dos ovos nos grupos UV-A ($p \leq 0,01$), UV-B ($p \leq 0,0001$) e UV-B+UV-A ($p \leq 0,0001$). Já para as idades 2 e 3 não foram observadas diferenças no volume dos ovos entre os grupos (figura 9).

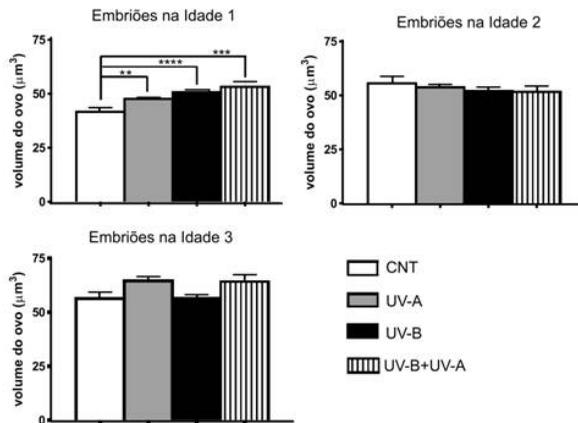


Figura 9: Efeitos das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A no volume do ovo de *M. olfersi* nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro. (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

A quantidade de água presente nos ovos de *M. olfersi* é um critério importante de análise, pois durante o desenvolvimento ocorre incorporação de água, necessária aos movimentos do embrião e também

para o processo de eclosão. Observamos que a quantidade de água nos ovos apresentou um aumento ao longo do desenvolvimento em todos os grupos analisados. Os ovos irradiados com UV-B+UV-A na idade 2 apresentaram um aumento significativo no teor de água em comparação com os embriões dos grupos controle ($p \leq 0,05$) e irradiados com UV-A ($p \leq 0,05$). Nas idades 1 e 3, os embriões irradiados não apresentaram variação significativa no teor de água (figura 10).

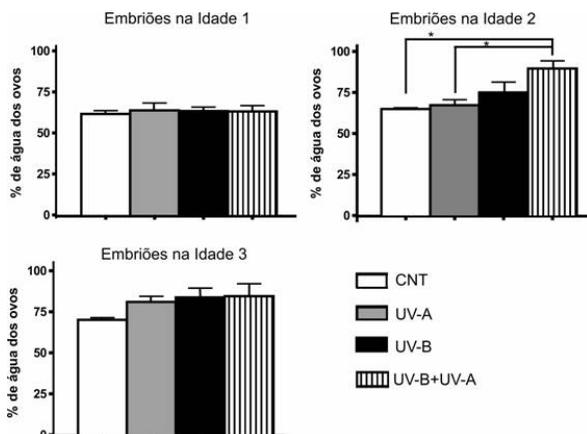


Figura 10: Efeitos das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A na porcentagem de água dos ovos de *M. olfersi* nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro. (*) $p \leq 0,05$.

O índice do olho é um dado complementar para a análise dos embriões, pois reflete o grau de desenvolvimento de estruturas internas. O índice do olho foi avaliado nas idades 2 e 3, pois na idade 1 os embriões ainda não apresentam olho. Para o índice do olho, os resultados não revelaram diferenças significativas entre os embriões controle e irradiados (figura 11).

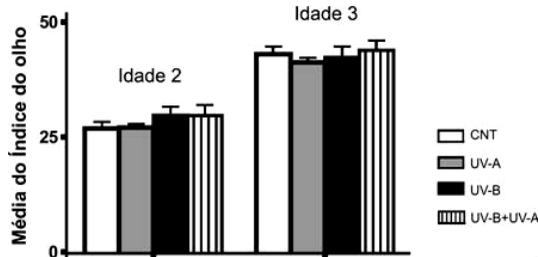


Figura 11: Efeitos das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A na média do índice do olho de embriões de *M. olfersi* nas idades 2 e 3.

4.2 Análises do ritmo do desenvolvimento

Os eventos do desenvolvimento de *M. olfersi* apresentam um ritmo característico para as três idades estudadas, sendo observado um atraso nesse ritmo nos grupos de embriões irradiados. Para esta análise foram utilizados em média 2461 ovos para o grupo UV-A; 2402 ovos para o grupo UV-B; 842 ovos para o grupo UV-B+UV-A.

Os grupos irradiados com UV-A e UV-B+UV-A nas idades 1 e 2 apresentaram número superior de embriões em atraso quando comparado ao grupo UV-B. A porcentagem de embriões em atraso no grupo UV-B na idade 1 foi semelhante a porcentagem de embriões em atraso no grupo UV-A na idade 2. Na idade 3 observou-se uma baixa frequência de embriões com atraso do ritmo do desenvolvimento em relação as outras duas idades e o grupo UV-B+UV-A não apresentou embriões com atraso (tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de embriões de *M. olfersi* que apresentaram atraso no ritmo do desenvolvimento nas idades 1, 2 e 3 e nos grupos irradiados com UV-A, UV-B e UV-B+UV-A.

IDADES	UV-A	UV-B	UV-B+A
1	81,41	63,77	100,00
2	62,60	49,48	85,61
3	4,36	0,16	0,00

4.3 Alterações morfológicas externas dos embriões

A avaliação morfológica externa realizada nos embriões controle e irradiados permitiu reconhecer 11 tipos diferentes de alterações. Para esta análise foram utilizados em média 2956 ovos para a idade 1, 2021 ovos para a idade 2; 1966 ovos para a idade 3. A ocorrência de alterações morfológicas externas torna-se mais visível com o avanço do desenvolvimento (figura 12).

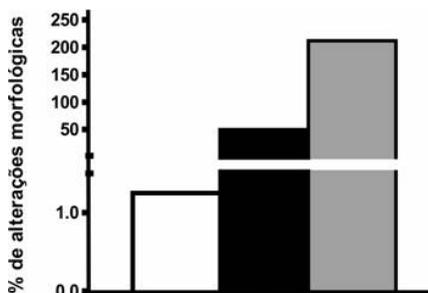


Figura 12: Porcentagem total de alterações morfológicas externas em embriões de *M. olfersi*. Estão incluídos embriões controle, irradiados com UV-A, UV-B e UV-A+UV-B, nas idades 1 (barra branca), 2 (barra preta) e 3 (barra cinza).

Na idade 1 os embriões apresentam cinco tipos de alterações e nas idades 2 e 3 foram registrados 10 e 11 tipos de alterações, respectivamente. Das alterações morfológicas externas observadas, os grupos UV-A e UV-B apresentaram mais alterações totais, sendo que os embriões do grupo UV-A apresentaram todos os tipos de alterações em pelo menos uma das idades. Os embriões controle apresentaram menor porcentagem de alterações morfológicas externas em relação aos embriões irradiados com UV, nas três idades (Tabela 3).

Na idade 1, os embriões do grupo UV-B apresentaram mais alterações totais em relação aos outros grupos. Na idade 2 a alteração morfológica mais significativa observada em todos os grupos foi olho com pigmentação branca. Os embriões do grupo UV-B apresentaram novamente nesta idade um total maior de alterações em relação aos outros grupos. Na idade 3 as alterações mais frequentes em todos os grupos foram mancha branca no cromatóforo, presente em todos os embriões dos grupos UV-B e UV-B+UV-A, e olho com pigmentação branca, presente em mais de 90 % dos embriões dos grupos UV-A, UV-B e UV-B+UV-A (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição das alterações morfológicas externas observadas nos embriões de *M. offersi* e a porcentagem em cada um dos grupos e idades analisadas.

IDADE 1					
Descrição dos fenótipos	CNT (n = 1341)	UV-A (n = 2319)	UV-B (n = 1612)	UV-B+A (n = 640)	Total (n = 5912)
Ovo estourado	0,15	0,60	0,74	-	0,47
Menor eixo longitudinal do ovo	-	0,26	-	-	0,10
Maior eixo longitudinal do ovo	-	0,09	0,62	-	0,20
Alteração na granulação do vitelo	-	0,47	0,37	-	0,29
Coloração opaca do embrião	-	0,22	0,37	-	0,19
Total	0,15	1,64	2,11	-	

IDADE 2					
Descrição dos fenótipos	CNT (n = 529)	UV-A (n = 1992)	UV-B (n = 966)	UV-B+A (n = 556)	Total (n = 4043)
Ovo estourado	-	1,36	1,04	-	0,92
Forma irregular do ovo	-	0,05	-	0,18	0,05
Menor eixo longitudinal do ovo	-	0,05	-	-	0,02
Maior eixo longitudinal do ovo	0,38	2,06	0,31	-	1,14
Alteração na granulação do vitelo	-	1,96	1,24	0,18	1,29
Ecloração precoce do embrião	-	1,41	0,31	-	0,77
Coloração opaca do embrião	-	3,87	11,08	-	4,55
Alteração morfológica do olho	0,19	2,16	0,52	14,39	3,19
Olho com pigmentação branca	18,53	36,40	31,16	22,66	30,92
Mancha branca no cromatóforo	18,53	1,86	10,14	-	5,76
Total	37,62	51,15	55,80	37,41	

IDADE 3

Descrição dos fenótipos	CNT (n = 605)	UV-A (n = 612)	UV-B (n = 2226)	UV-B+A (n = 489)	Total (n = 3932)
Ovo estourado	-	0,81	-	-	0,46
Forma irregular do ovo	-	3,01	-	-	1,70
Menor eixo longitudinal do ovo	-	0,22	0,33	0,61	0,25
Maior eixo longitudinal do ovo	-	2,88	0,16	1,43	1,83
Alteração na granulação do vitelo	-	3,23	0,82	0,41	2,01
Ecloração precoce do embrião	0,66	6,74	0,65	2,86	4,37
Coloração opaca do embrião	8,26	19,90	11,76	5,52	15,06
Alteração morfológica do olho	8,76	12,71	1,31	3,07	9,13
Olho com pigmentação branca	66,94	92,41	98,69	100,00	90,41
Pigmentação ectópica do olho	-	10,33	25,00	0,61	9,82
Mancha branca no cromatóforo	66,94	68,01	100,00	100,00	76,81
Total	151,57	220,26	238,73	214,52	

As observações morfológicas foram observadas em maior percentagem nos grupos irradiados com UV-A e UV-B. As alterações morfológicas aumentam ao longo do desenvolvimento. Os tipos de alterações mais evidentes foram o olho com pigmentação branca nas idades 2 e 3, e a mancha branca no cromatóforo dos embriões na idade 3. n = número total de ovos analisados. Total = valor em percentagem.

As alterações observadas nos embriões, descritas na tabela 3, estão ordenadas de acordo com a similaridade dos fenótipos, podendo ser organizadas da seguinte forma:

- Alterações relacionadas ao ovo e vitelo
 - Ovo estourado (figura 13, f, i)
 - Forma irregular do ovo (figura 13, d, e, g)
 - Menor eixo longitudinal do ovo (figura 13, e)
 - Maior eixo longitudinal do ovo (figura 13, c)
 - Alteração na granulação do vitelo (figura 13, a, d, k)
- Alterações relacionadas à integridade das estruturas embrionárias
 - Coloração opaca do embrião (figura 13, a, e, g, i, l)
 - Mancha branca no cromatóforo (figura 13, h)

- Alteração morfológica do olho (figura 13, b, d, e, f, i, k)
- Olho com pigmentação branca (figura 13, c, g, h, l)
- Pigmentação ectópica do olho (figura 13, j)
- Eclusão precoce do embrião (figura 13, l)

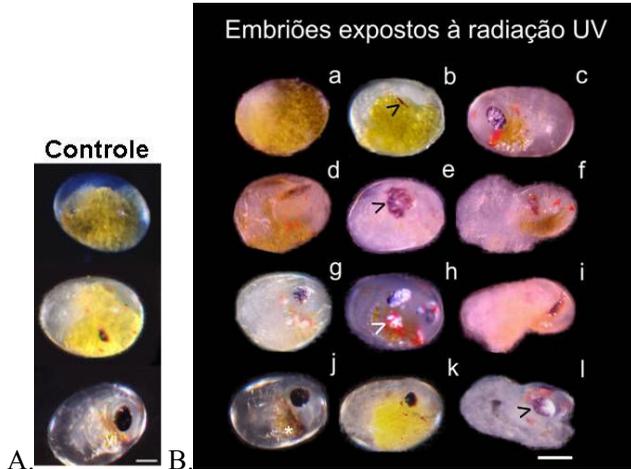


Figura 13: Embriões de *M. offersi* controle nas idades 1, 2 e 3 (A) apresentando suas características morfológicas externas típicas e tipos de alterações morfológicas externas observadas em embriões irradiados com UV (B). Cabeça de seta preta no embrião na idade 2 (b) e no embrião na idade 3 (e) indica alteração morfológica do olho; a seta preta no embrião na idade 3 em (l) indica olho com pigmentação branca; cabeça de seta branca em (h) indica mancha branca no cromatóforo no embrião na idade 3; asterisco branco em (j) indica a região onde ocorreu a pigmentação ectópica do olho no embrião na idade 3. Barra = 200 μ m.

Estes resultados mostram que os embriões podem apresentar mais de um tipo de alteração morfológica externa e uma mesma alteração pode ser observada em diferentes graus de severidade.

A figura 13 (b) corresponde a um olho vestigial em um embrião E8, sendo que esta alteração foi observada também no embrião E13 (figura 13, k). A pigmentação ectópica do olho (j) foi observada somente nos embriões da idade 3. De todas as alterações observadas nos embriões, as que apresentaram frequência mais significativa nos embriões na idade 2 e 3 foram as relacionadas à integridade das estruturas embrionárias, especificamente a mancha branca no cromatóforo e o olho com pigmentação branca (figura 13, h, l). A figura 14 representa a porcentagem dessas duas alterações em cada um dos

grupos irradiados e controle. Para essas alterações, os grupos UV-B e UV-B+UV-A apresentam baixa frequência na idade 2, já na idade 3 essas alterações aumentam consideravelmente.

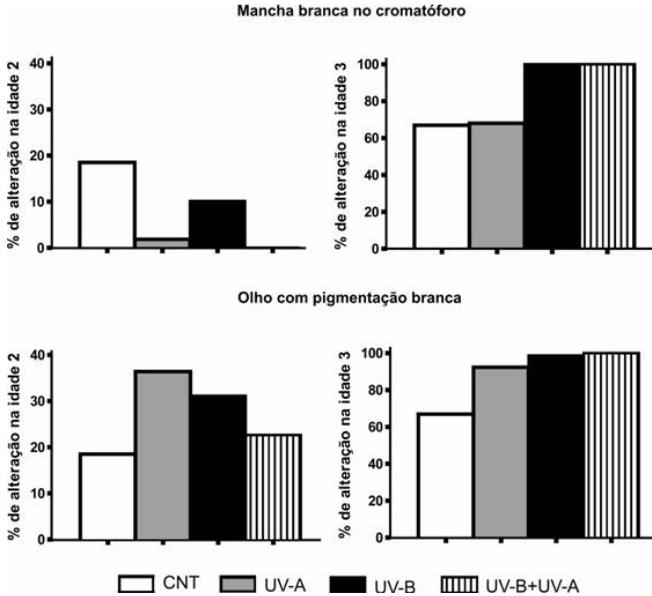


Figura 14: Porcentagem de alterações nas estruturas embrionárias de *M. olfersi* do grupo controle e dos grupos expostos às radiações UV-A, UV-B, UV-B+UV-A nas idades embrionárias 2 e 3.

4.4 Análises da morfologia interna dos embriões

No presente trabalho avaliou-se também a morfologia interna dos embriões com intuito de investigar o efeito da radiação sobre os mecanismos celulares de proliferação e apoptose, bem como de respostas aos danos citoplasmáticos e nucleares. A figura 15 apresenta esquemas e fotos da morfologia externa normal dos embriões nas três idades e cortes sagitais correspondentes visando à compreensão das metodologias de análises microscópicas adotadas neste estudo.

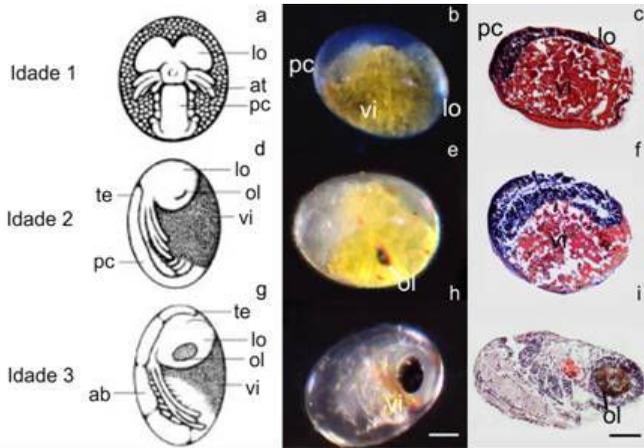


Figura 15: Esquemas (a, d, g), fotos do embrião *M. olfersi in vivo* (b, e, h) e em cortes sagitais corados com HE (c, f, i) nas três idades embrionárias. ab: abdômen; at: antena; lo: lobo óptico; ol: olho; pc: papila caudal; te: telson; vi: vitelo. Barra = 200 um (b, e, h) e barra = 100 μm (c, f, i).

4.5 Proliferação celular

Para avaliar os efeitos da radiação UV na proliferação celular dos embriões, foi utilizada a proteína fosfo-histona H3 como marcador de mitose (figura 16). A análise da proliferação celular nos embriões do grupo controle revelou que ocorre uma diminuição neste mecanismo celular ao longo do desenvolvimento.

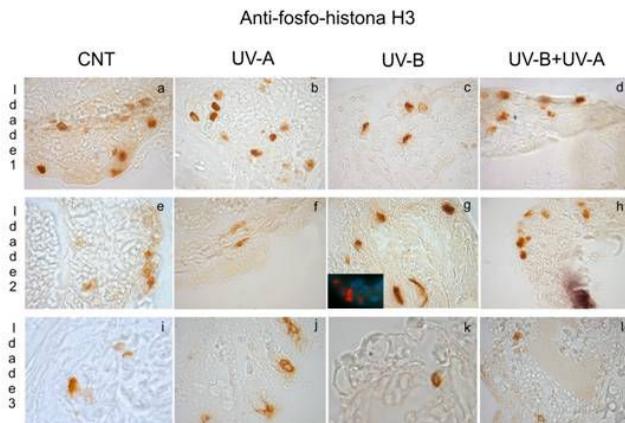


Figura 16: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-fosfo-histona H3. Cortes histológicos dos embriões *M. olfersi* controle e irradiados nas três idades. O inserto da figura (g) representa a imuno-histoquímica para microscopia de fluorescência para esta mesma proteína. Barra = 10 μ m.

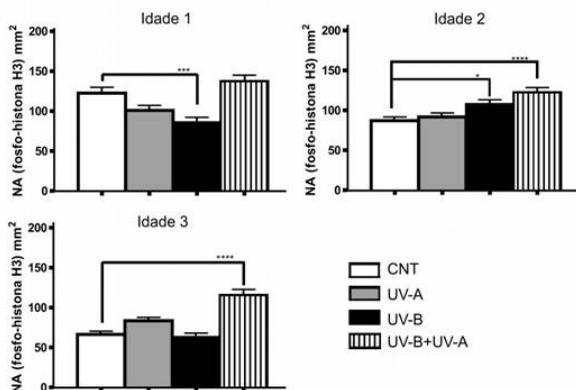


Figura 17: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para fosfo-histona H3 nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (*) $p \leq 0,05$; (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

Na idade 1 os embriões irradiados com UV-B+UV-A apresentaram densidade numérica de proliferação celular significativamente maior que os do grupo UV-B ($85,94 \pm 6,25$; $p \leq 0,0001$) e do grupo UV-A ($100,84 \pm 6,43$; $p \leq 0,0001$). Os embriões irradiados com UV-B apresentaram densidade numérica de proliferação

celular significativamente menor que os do grupo controle ($122,62 \pm 7,33$; $p \leq 0,001$). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,236)} = 28,29$; $p \leq 0,0001$) revelando que a irradiação UV-A após a irradiação com UV-B reverteu a diminuição da proliferação celular induzida pela irradiação UV-B (figura 17).

Na idade 2 os embriões do grupo UV-B apresentaram densidade numérica de proliferação celular significativamente maior que o grupo controle ($87,09 \pm 4,59$; $p \leq 0,03$). Os embriões do grupo UV-B+UV-A apresentaram densidade numérica de proliferação celular significativamente maior que os do grupo UV-A ($91,68 \pm 5,09$; $p \leq 0,0001$) e o grupo controle ($87,09 \pm 4,59$; $p \leq 0,0001$). Nesta idade, a interação entre as radiações UV-B x UV-A, avaliada pela ANOVA de duas vias, não foi significativa, revelando que a radiação UV-A não foi capaz de reverter o aumento da proliferação celular induzida pela radiação UV-B.

Na idade 3, a densidade numérica de proliferação celular observada nos embriões do grupo UV-B+UV-A foi significativamente maior em relação aos grupos controle ($66,46 \pm 4$; $p \leq 0,0001$), UV-A ($83,65 \pm 4$; $p \leq 0,0001$) e UV-B ($63,03 \pm 5$; $p \leq 0,0001$). O grupo UV-A apresentou densidade numérica de proliferação celular maior ($p \leq 0,02$) que o grupo UV-B. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,236)} = 11,86$; $p \leq 0,0007$) (figura 17).

4.6 Apoptose

Para investigar se a radiação UV induz apoptose nos embriões, foram utilizadas as proteínas caspase 8 e caspase 3 como marcadores celulares associadas, respectivamente, a via apoptótica extrínseca e ao final da via apoptótica (figura 18, 20, 22).

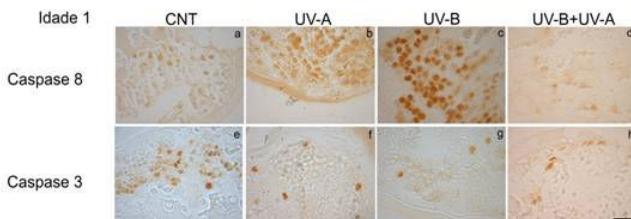


Figura 18: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-caspase 8 (a, b, c, d) e anti-caspase 3 (e, f, g, h). Cortes histológicos dos embriões *M. olfersi* controle e irradiados na idade 1. Barra = 10 μm .

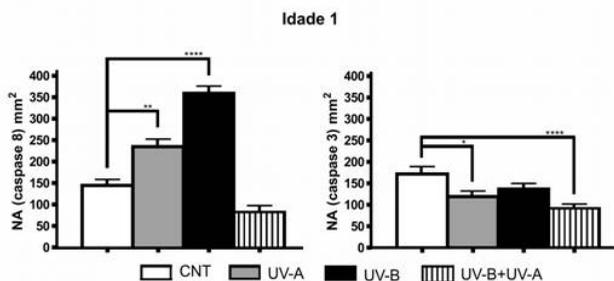


Figura 19: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para caspase 8 e caspase 3, na idade 1. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (****) $p \leq 0,0001$.

Na idade 1, o grupo de embriões irradiados com UV-B apresentou densidade numérica de células positivas para caspase 8 ($360,11 \pm 16$) significativamente maior em relação aos grupos controle ($144,39 \pm 14,20$; $p \leq 0,0001$), o grupo UV-A ($234,92 \pm 17,56$; $p \leq 0,0001$) e o grupo UV-B+UV-A ($82,51 \pm 14,90$; $p \leq 0,0001$). O grupo UV-A também apresentou densidade numérica maior em relação ao grupo controle ($144,39 \pm 14,20$; $p \leq 0,002$) e UV-B+UV-A ($p \leq 0,0001$). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,216)} = 104,48$; $p \leq 0,0001$) demonstrando que a irradiação UV-A após a irradiação com UV-B reverteu o aumento da indução de caspase 8 pela irradiação UV-B e UV-A sozinhas (figura 19).

A densidade numérica de células positivas para caspase 3 na idade 1 mostrou que os grupos irradiados com UV-A ($119,18 \pm 13$; $p \leq 0,03$) e com UV-B+UV-A ($91,68 \pm 10$; $p \leq 0,0001$) exibiram densidades menores em relação ao grupo controle ($171,89 \pm 17,11$). A ANOVA de duas vias não mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A, mas mostrou que as irradiações UV-A ($f_{(1,236)} = 5,37$; $p \leq 0,02$) e UV-B ($f_{(1,236)} = 13,62$; $p \leq 0,0003$) sozinhas apresentam efeito significativo (figura 19 e 20).

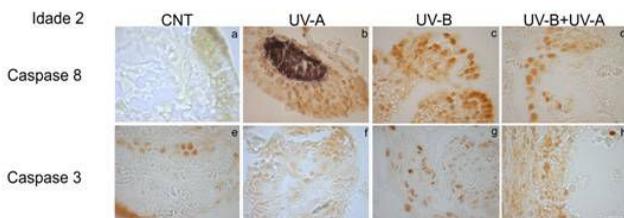


Figura 20: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-caspase 8 (a, b, c, d) e anti-caspase 3 (e, f, g, h). Cortes histológicos de embriões controle e irradiados na idade 2. Na figura (b) o corte do tecido embrionário permite visualizar as células pigmentadas que compõem a estrutura do olho. Barra = 10 µm.

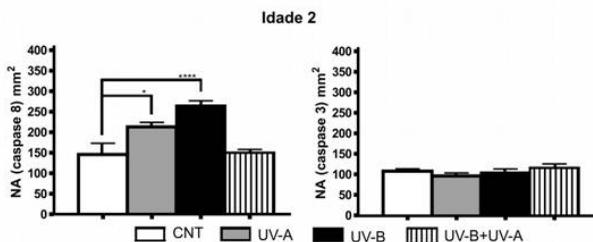


Figura 21: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para caspase 8 e caspase 3 na idade 2. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (*) $p \leq 0,05$; (***) $p \leq 0,0001$.

Na idade 2, os grupos irradiados com UV-B ($p \leq 0,0001$) e com UV-A ($p \leq 0,02$) apresentaram densidade numérica de células positivas para caspase 8 maior do que o grupo controle ($145,76 \pm 27,41$) e UV-B+UV-A ($150,12 \pm 8,09$). A interação entre as radiações UV-B x UV-A revelou através da ANOVA de duas vias, um efeito significativo ($f_{(1,226)} = 35,15$; $p \leq 0,0001$) e que a irradiação UV-A após a irradiação UV-B

reverteu as alterações induzidas pelas radiações UV-B e UV-A sozinhas. A densidade numérica de caspase 3 em embriões na idade 2 de todos os grupos não apresentaram diferença significativa entre eles (figura 21).

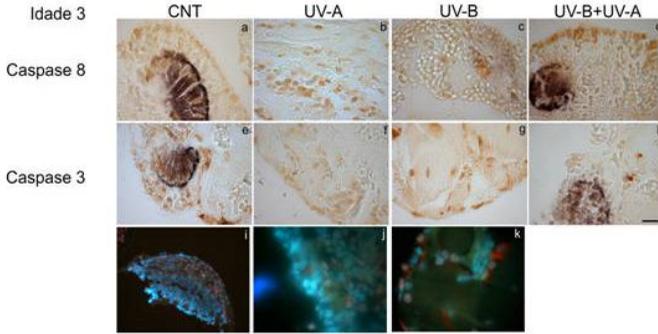


Figura 22: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-caspase 8 (a, b, c, d), anti-caspase 3 (e, f, g, h) e imuno-histoquímica de fluorescência utilizando o anticorpo anti-caspase 3 e DAPI (i, j, k). Tecidos de embriões *M. olfersi* controle e irradiados na idade 3. Barra = 10 µm.

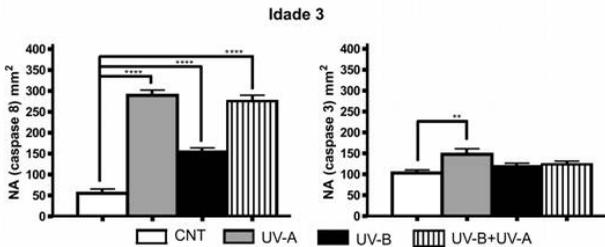


Figura 23: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para caspase 8 e caspase 3 na idade 3. Barras representam a média ± erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (***) $p \leq 0,005$; (****) $p \leq 0,0001$.

Na idade 3 a densidade numérica de células positivas para caspase 8 nos grupos UV-A ($289,64 \pm 12,64$; $p \leq 0,0001$), UV-B ($154,70 \pm 9$; $p \leq 0,0001$) e UV-B+UV-A ($275,97 \pm 13,91$; $p \leq 0,0001$) foi significativamente maior que no grupo controle ($55 \pm 10,51$). Entre os grupos irradiados, a densidade numérica do grupo UV-B foi menor ($154,70 \pm 9$; $p \leq 0,0001$) em relação aos grupos UV-A e UV-B+UV-A. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,249)} = 18,96$; $p \leq 0,0001$),

modificando a resposta observada quando foram aplicadas as radiações UV-B e UV-A sozinhas (figura 23).

Na idade 3 apenas o grupo UV-A apresentou densidade numérica de células positivas para caspase 3 maior do que o grupo controle ($103,14 \pm 7,41$; $p \leq 0,004$). A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,236)} = 4,60$; $p \leq 0,03$) assemelhando-se ao controle (figura 23).

Em complemento da avaliação da apoptose induzida pela radiação UV, foi analisada a expressão da proteína pró-apoptótica Bak e da proteína anti-apoptótica Bcl2 (figuras 24 e 26).

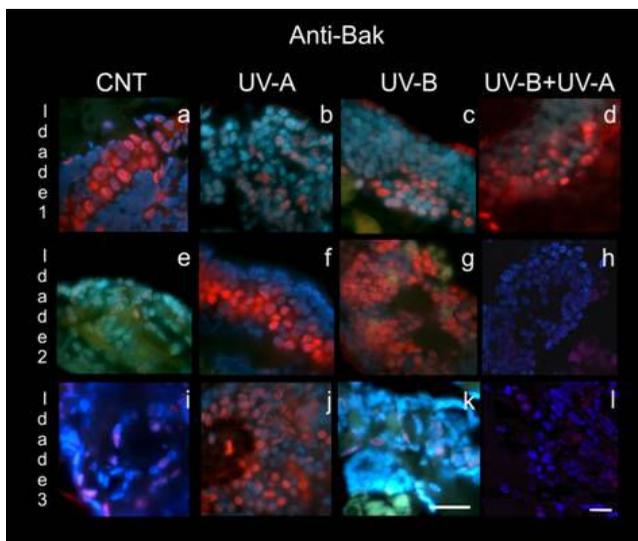


Figura 24: Imuno-histoquímica para microscopia de fluorescência utilizando o anticorpo anti-Bak. Tecidos de embriões controle e irradiados nas três idades. Barra = 10 μ m (a – g, i – k). Barra = 20 μ m (h, l).

Em todas as idades e em todos os grupos Bak foi observada no núcleo celular (figura 24). Na idade 1, a densidade numérica de células positivas para Bak não foi significativamente diferente entre os grupos. Na idade 2 os embriões dos grupos UV-A ($48,60 \pm 2,15$; $p \leq 0,006$) e UV-B ($50,85 \pm 6,5$; $p \leq 0,002$) apresentaram densidade numérica maior que os embriões do grupo controle ($26,74 \pm 3$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo ($f_{(1,21)} = 21,48$; $p \leq 0,0001$) da interação entre as radiações UV-B x UV-A, recuperando o aumento da expressão

da proteína Bak nos embriões induzido pela radiação UV-B e UV-A isoladamente (figura 25).

Na idade 3, a densidade numérica de células positivas para Bak no grupo UV-A ($70,39 \pm 2,53$) foi maior que nos grupos controle ($38 \pm 1,45$; $p \leq 0,0002$), UV-B ($29,62 \pm 4,21$; $p \leq 0,0002$) e UV-B+UV-A ($35,68 \pm 4,42$; $p \leq 0,0002$). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,22)} = 15,31$; $p \leq 0,0007$) e que a irradiação UV-A após a irradiação com UV-B apresentou nos embriões densidade numérica de células reativas para Bak semelhante ao controle (figura 25).

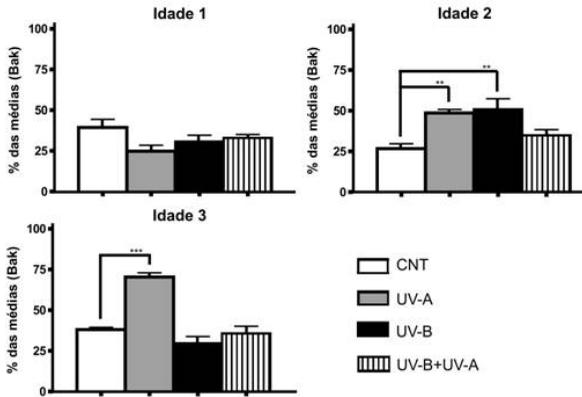


Figura 25: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para Bak nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

Na idade 1, os embriões irradiados com UV-B apresentaram densidade numérica de células positivas para a proteína Bcl2 ($293,94 \pm 23,37$) significativamente maior que os embriões do grupo controle ($213,15 \pm 11,18$; $p \leq 0,009$).

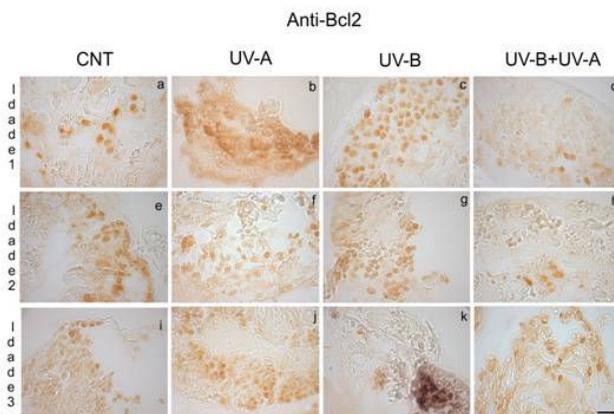


Figura 26: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-Bcl2. Tecidos de embriões controle e irradiados nas três idades. Barra = 10 μ m.

Na idade 1, o grupo UV-B+UV-A ($60,16 \pm 35,54$) apresentou densidade numérica menor em relação aos grupos controle ($213,15 \pm 11,18$; $p \leq 0,04$), UV-A ($245,56 \pm 29,53$; $p \leq 0,01$) e UV-B ($293,94 \pm 23,37$; $p \leq 0,0005$). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,111)} = 18,16$; $p \leq 0,0001$), revelando que a irradiação UV-A após a irradiação com UV-B reverteu o aumento da expressão da proteína Bcl2 induzida pela irradiação UV-B.

Na idade 2, o grupo de embriões irradiados com UV-A ($228,04 \pm 11,85$) apresentou densidade numérica de células positivas para Bcl2 menor que do grupo controle ($375,14 \pm 15,75$; $p \leq 0,0001$), do grupo UV-B ($375,87 \pm 22,45$; $p \leq 0,0001$) e maior que do grupo UV-B+UV-A ($140,95 \pm 10,14$; $0,007$). O grupo UV-B+UV-A também apresentou densidade numérica menor em relação aos grupos controle ($p \leq 0,0001$) e UV-B ($p \leq 0,0001$). A interação entre as radiações UV-B x UV-A demonstrou efeito significativo ($f_{(1,197)} = 6,46$; $p \leq 0,01$) da radiação UV-A após a radiação com UV-B.

Na idade 3, o grupo irradiado com UV-A apresentou densidade numérica de células positivas para Bcl2 ($371,29 \pm 21,77$) maior que os grupos controle ($178,77 \pm 22$; $p \leq 0,0001$) e irradiados com UV-B ($158,14 \pm 17,36$; $p \leq 0,0001$) e UV-B+UV-A ($213,15 \pm 15,54$; $p \leq 0,0001$). A interação entre as radiações UV-B x UV-A foi significativa

($f_{(1,136)} = 7,73$; $p \leq 0,006$), apresentando a expressão da proteína Bcl2 semelhante com a do controle (figura 27).

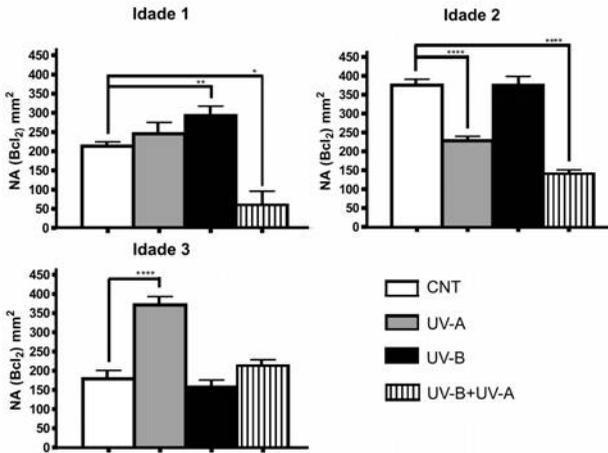


Figura 27: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para Bcl2 nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,0001$.

4.7 Danos no citoplasma e no núcleo

A ocorrência de danos na célula induzidos pela radiação UV foi verificada pela presença da proteína Hsp 70, expressa no citoplasma e da proteína p53, expressa no núcleo (figuras 28 e 30).

Na idade 1, os embriões irradiados com UV-A apresentaram densidade numérica de células positivas para p53 ($433,17 \pm 34,25$) maior que os grupos controle ($214,87,14 \pm 12,12$; $p \leq 0,0001$), UV-B ($264,71 \pm 18,86$; $p \leq 0,0001$) e UV-B+UV-A ($66,21 \pm 14,92$; $p \leq 0,0001$). Os embriões irradiados com UV-B+UV-A apresentaram densidade numérica menor ($p \leq 0,0001$) que os grupos controle, UV-A ($433,17 \pm 34,25$; $p \leq 0,0001$) e UV-B ($p \leq 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação entre as radiações UV-B x UV-A ($f_{(1,103)} = 114,46$; $p \leq 0,0001$), sendo a densidade numérica de células no grupo UV-B+UV-A menores ao controle.

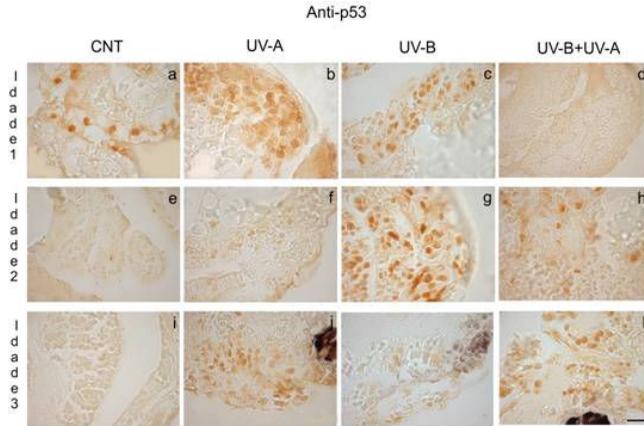


Figura 28: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-p53. Tecidos de embriões *M. olfersi* controle e irradiados nas três idades. Barra = 10 μ m.

Na idade 2, o grupo UV-B+UV-A apresentou densidade numérica de células positivas para p53 significativamente menor que a do grupo controle ($284,20 \pm 32,48$; $p \leq 0,002$) e a do grupo UV-B ($340,35 \pm 20,46$; $p \leq 0,0001$). Por outro lado, o grupo UV-B apresentou densidade numérica ($340,35 \pm 20,46$) maior que o grupo UV-A ($225,75 \pm 14,91$; $p \leq 0,001$). A ANOVA de duas vias mostrou que a interação entre as radiações UV-B+UV-A tem papel reparador ($f_{(1,216)} = 8,06$; $p \leq 0,005$) e que a radiação UV-A após a radiação com UV-B reverteu o aumento da expressão da proteína p53 induzido pela radiação UV-B.

Na idade 3, todos os grupos diferiram entre si. Apenas os embriões do grupo controle não apresentaram marcações para a proteína p53. O grupo UV-B apresentou densidade numérica de células positivas para p53 ($98,55 \pm 16$) significativamente menor que o grupo UV-A ($275,03 \pm 17,46$; $p \leq 0,001$) e UV-B+UV-A ($202,83 \pm 13,02$; $p \leq 0,001$). A ANOVA de duas vias mostrou que a interação entre as radiações UV-B+UV-A foi significativa ($f_{(1,152)} = 24,94$; $p \leq 0,0001$) (figura 29).

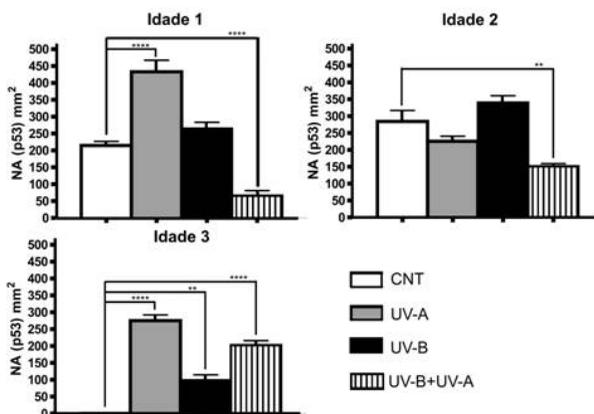


Figura 29: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para p53 nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (**) $p \leq 0,01$; (****) $p \leq 0,0001$.

Com relação à expressão da proteína Hsp70, na idade 1, as médias da densidade numérica de células positivas não diferiram significativamente entre os grupos controle, UV-A e UV-B. O grupo irradiado com UV-B+UV-A apresentou densidade numérica menor de células positivas para Hsp70 em relação aos grupos controle ($218,30 \pm 18,09$; $p \leq 0,0002$), UV-A ($220,02 \pm 39,46$; $p \leq 0,04$) e UV-B ($209,71 \pm 19,86$; $p \leq 0,0004$). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo na interação entre as radiações UV-B+UV-A ($f_{(1,116)} = 6,74$; $p \leq 0,01$).

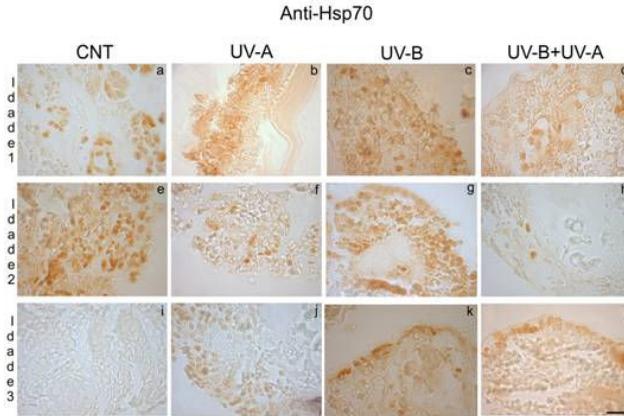


Figura 30: Imuno-histoquímica para microscopia de luz utilizando o anticorpo anti-Hsp70. Tecidos de embriões *M. olfersi* controle e irradiados nas três idades. Barra = 10 μ m.

Na idade 2, as médias dos grupos controle, UV-A e UV-B também não apresentaram diferenças significativas e a densidade numérica de células positivas para Hsp70 do grupo irradiado com UV-B+UV-A foi menor que a dos grupos controle, ($269,53 \pm 25,15$; $p \leq 0,0001$), UV-A ($239,67 \pm 13,63$; $p \leq 0,002$) e UV-B ($279,15 \pm 16,95$; $p \leq 0,0001$). A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da interação entre as radiações UV-B+UV-A ($f_{(1,196)} = 14,79$; $p \leq 0,0002$).

Na idade 3, o grupo controle não apresentou expressão da proteína Hsp 70, diferindo dos grupos UV-A ($240,65 \pm 10$; $p \leq 0,0001$), UV-B ($166,74 \pm 11$; $p \leq 0,0001$) e UV-B+UV-A ($201,11 \pm 12,9$; $p \leq 0,0001$). O grupo UV-B diferiu do grupo UV-A ($240,65 \pm 10$; $p \leq 0,0001$), apresentando menor densidade numérica de células positivas para Hsp70. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da interação entre as radiações UV-B+UV-A ($f_{(1,157)} = 72,92$; $p \leq 0,0001$) (figura 31).

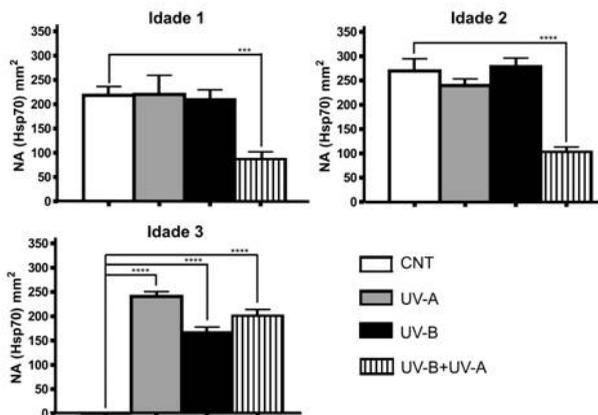


Figura 31: Densidade numérica por área (NA) de células reativas para Hsp70 nas três idades embrionárias. Barras representam a média \pm erro e as diferenças significativas são representadas somente em relação ao controle. (***) $p \leq 0,001$; (****) $p \leq 0,0001$.

4.8 Dímeros de pirimidina

Dímeros de pirimidina são ligação entre as pirimidinas no DNA, induzidas pela radiação UV. A imuno-histoquímica de fluorescência e colorimétrica, utilizando um marcador específico, anti-dímeros de pirimidina, foi realizada em todas as idades e grupos, porém não foi possível observar os dímeros de pirimidina.

Anti-dímero de pirimidina

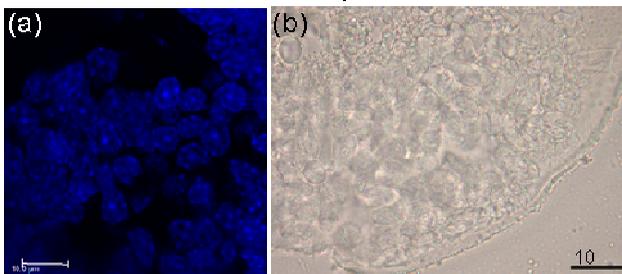


Figura 32: Imuno-histoquímica utilizando o anticorpo anti-dímero de pirimidina. Microscopia de confocal utilizando o anticorpo anti-dímero de pirimidina e a sonda fluorescência DAPI (a). Microscopia de luz utilizando o

anticorpo anti-dímero de pirimidina (b). Não foi verificada a marcação de dímeros de pirimidina. Barra = 10 μm .

Em geral, o quadro 4 representa uma visão geral dos resultados obtidos neste estudo, demonstrando os efeitos variados nos embriões expostos à radiação UV. A análise do quadro referente ao grupo controle permite reconhecer as características próprias dos embriões de *M. olfersi* ao longo do desenvolvimento.

Quadro 4: Visão geral do conjunto de resultados. Os resultados dos grupos irradiados são comparados aos do controle.

		CNT			UV-A			UV-B			UV-A+UV-B			
		Idades												
Resultados		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Biometria dos ovos e dos embriões	Volume do ovo (μm^3)	41,6	55,6	56,4	↑	/	/	↑	/	/	↑	/	/	
	Teor de água (%)	61,6	64,9	70,1	/	/	/	/	/	/	/	↑	/	
	Índice do olho	*	26,7	43,0	*	/	/	*	/	/	*	/	/	
Morfologia externa dos embriões	Alterações	-	++	++ +	-	++	++ +	-	+ +	++ +	-	+ +	++ +	
Atraso no ritmo do desenvolvimento		E0 - 6	E7 - 9	E10 - 14	+ +	++	-	+ +	+	-	+ +	+ +	/	
Morfologia interna dos embriões	Proliferação celular	③	②	②	/	/	/	↓	↑	/	/	↑	↑	
	Apoptose	Caspase 8	③	③	②	↑	↑	↑	↑	↑	↑	/	/	↑
		Caspas 3	③	③	③	↓	/	↑	/	/	/	↓	/	/
		Bak	①	①	①	/	↑	↑	/	↑	/	/	/	/
	Danos celulares	Bcl 2	④	⑤	③	/	↓	↑	↑	/	/	↓	↓	/
		p53	④	④	⑥	↑	/	↑	/	/	↑	↓	↓	↑
Hsp 70		④	④	⑥	/	/	↑	/	/	↑	↓	↓	↑	

Para diferença estatística:

⬆️: *** aumentou

⬆️: ** aumentou

⬆️: * aumentou

⬆️: * diminuiu

⬆️: ** diminuiu

⬆️: *** diminuiu

Para todos: / : sem alteração

Para porcentagem:

+++ : maior que 100%

++ : maior que 50%

+ : menor que 50%

- : menor que 5%

*: não se aplica

Para médias de NA:

⓪: NA = 0

①: NA < 50

②: NA > 50

③: NA > 100

④: NA > 200

⑤: NA > 300

⑥: NA > 400

Grupo controle: Observa-se que os dados biométricos como volume do ovo, % de água e índice do olho aumentam ao longo do desenvolvimento. A proliferação celular diminui nas idades 2 e 3, pois no início do período embrionário é necessário que este mecanismo do desenvolvimento ocorra com maior intensidade. A proteína p53 também está presente durante o desenvolvimento, mas está ausente na idade 3, indicando que nesta idade os tecidos dos embriões já diferenciaram e estes estão se preparando para a eclosão. No entanto, nesta idade observam-se mais alterações morfológicas externas, principalmente nas estruturas embrionárias, provavelmente porque a diferenciação já ocorreu. A expressão da proteína caspase 8 permanece constante até a idade 3, quando ocorre uma diminuição da sua expressão, o que pode ser um indicativo de que a sinalização para apoptose começa a diminuir. Os níveis da proteína caspase 3 se mantêm similares ao longo das idades, induzindo a apoptose durante todo o desenvolvimento. A proteína Bak também está constantemente presente durante o desenvolvimento, pode ser que esta proteína desempenhe um papel no desenvolvimento, outra hipótese é que exista uma reserva desta proteína na célula, para quando sua atividade for necessária. A expressão da proteína Bcl2 aumenta na idade 2 e diminui na idade 3. A idade 2 parece ser um período crítico do desenvolvimento, onde ocorrerem muitas modificações no embrião. A proteína Hsp70 está presente nas idades 1 e 2, provavelmente atuando na organização correta das proteínas durante o desenvolvimento, porém na idade 3 ela está ausente.

Grupo UV-A: Os embriões apresentaram aumento no volume do ovo e menor expressão da caspase 3 na idade 1, além de atraso no ritmo do desenvolvimento nas idades 1 e 2. O aumento de p53 na idade 1 indica que essa proteína possa estar induzindo o atraso no ciclo celular e conseqüentemente, impedindo a apoptose, a fim de reparar danos, já na idade 2 os seus níveis se normalizam. Na idade 2, observou-se que a expressão de Bak aumenta e de Bcl2 diminui. A expressão da caspase 8 esteve aumentada durante as três idades, principalmente na idade 3, indicando que ocorreu um estímulo de estresse celular suficiente para ativar a via extrínseca apoptótica. As proteínas caspase 3, Bak, Bcl2, Hsp70 e p53 também apresentaram aumento na sua expressão na idade 3. Estes resultados podem mostrar que nessa idade o embrião é mais sensível, ou que nessa idade os mecanismos celulares estão mais ativos, como os de defesa - Hsp70 e Bcl2 - e os pró-apoptóticos como a p53, Bak, caspase 8 e caspase 3. Os embriões deste grupo, assim como no

controle, apresentaram alterações morfológicas externas nas idades 2 e 3, mas a proliferação celular não alterou em nenhuma idade.

Grupo UV-B: Os embriões apresentaram aumento do volume do ovo e da proteína Bcl2, menor proliferação celular na idade 1 e atraso no ritmo do desenvolvimento nas idades 1 e 2. Entretanto, nesta idade os embriões apresentaram menor expressão de p53. Os níveis de caspase 8 foram maiores do que os apresentados pelo grupo UV-A, em todas as idades. p53 e Hsp 70 também foram maiores na idade 3 e as alterações morfológicas foram mais frequentes nas idades 2 e 3. Bak apresentou maior expressão somente na idade 2 e caspase 3 não alterou sua expressão em nenhuma idade.

Grupo UV-B+UV-A: Os embriões apresentaram 100% de atraso no ritmo de desenvolvimento na idade 1 e mais de 85% na idade 2. O volume do ovo estava aumentado na idade 1 e somente neste grupo a porcentagem de água foi maior na idade 2. No entanto, p53, Bcl2, Hsp70 apresentaram expressão menor nessas duas idades. A expressão da caspase 3 foi menor na idade 1 e a expressão da proteína Bak não apresentaram variações em nenhuma das idades. Na idade 3 ocorreu maior expressão das proteínas caspase 8, p53 e Hsp70 e as alterações morfológicas externas foram mais frequentes nas idades 2 e 3. A proliferação celular foi maior nas idades 1 e 2.

5. Discussão

Os efeitos da radiação UV nos ambientes aquáticos vem sendo pesquisados nas últimas décadas devido ao reconhecimento dos danos morfológicos e celulares que ela pode causar nos organismos (Kirchhoff *et al.*, 1996; Naganuma *et al.*, 1997; Lacuna e Uye, 2001; Dong *et al.*, 2007). As radiações UV-A e UV-B penetram nos ambientes aquáticos e atingem tanto os invertebrados como os vertebrados que estão expostos à radiação UV durante todo o seu ciclo de vida. Os embriões que se desenvolvem nos ambientes aquáticos, requerem maior preocupação, pois estudos sugerem que essa é a fase de vida menos tolerante aos danos da radiação UV (Naganuma *et al.*, 1997; Charron *et al.*, 2000; Bonaventura *et al.*, 2006; Bancroft *et al.*, 2007).

Neste trabalho analisamos alguns mecanismos de defesa utilizados pelos embriões de *M. olfersi* em resposta à radiação UV, avaliando os efeitos morfológicos e moleculares das radiações UV-A, UV-B e UV-B+UV-A. A existência de um sistema de fotorreparo eficiente foi sugerida por Dong *et al.*, (2008) em embriões de zebrafish. Em 2007, o mesmo grupo de pesquisadores já havia descrito que estes embriões possuem um sistema de fotorreativação que pode ser estimulado pela exposição à radiação UV-A. Olson e Mitchell (2006) estudaram larvas de cinco espécies de peixes e encontraram evidências da presença de NER em todas as espécies e da fotorreativação em duas espécies. Estudos com crustáceos copépodos, realizados por Lacuna e Uye (2000; 2001), confirmaram os efeitos deletérios da radiação UV-B e que esses efeitos podem ser recuperados através do fotorreparo. Contudo, Vega e Epel (2004), em seus estudos com ouriços do mar, consideraram que estes mecanismos de reparos ao DNA, durante a embriogênese de invertebrados, ainda não estão bem esclarecidos.

Nossos dados mostram que às radiações UV-A e UV-B utilizadas isoladamente nos embriões causam efeitos diferentes; e embriões expostos à radiação UV-B seguida pela UV-A, apresentam efeitos mais atenuados, quando comparados com os embriões irradiados com UV-A ou UV-B. Dados semelhantes foram observados por Krutmann (2006) em seus estudos sobre a interação das radiações UV-A e UV-B utilizando células da pele humana. Segundo Krutmann (2006) e Dong *et al.* (2007), a radiação UV-A também causa danos celulares e moleculares, porém menos evidentes do que os causados pelas radiações UV-B e UV-C, devido à menor absorção direta de alvos biológicos, o que também pode ser observado no nosso trabalho.

Somosy (2000) mostrou que os diferentes tipos de radiações têm efeito sobre a célula e que as respostas celulares à exposição dessas radiações têm muitos elementos comuns; em geral, as células respondem com estresse e apoptose causada por danos ao DNA, alteração dos sinais de tradução ou instabilidade gênica.

5.1 Efeitos da radiação UV na idade 1

Os embriões na idade 1 não apresentaram alterações morfológicas externas significativas, pois a ocorrência das alterações não foi maior do que 1%, provavelmente porque nesta idade há um número reduzido de estruturas embrionárias.

O aumento no volume do ovo e o atraso no ritmo do desenvolvimento na idade 1, ocorridos principalmente nos embriões expostos as radiações UV-A e UV-B+UV-A, pode evidenciar um atraso no ciclo celular visando a recuperação de alguma alteração. Isto pode indicar que a irradiação dos embriões com UV-A após a irradiação com UV-B seja uma forma de recuperar os danos causados pela radiação UV-B. Porém este atraso no ritmo do desenvolvimento foi menos evidente nos embriões do grupo UV-B.

A análise da proliferação celular na idade 1 mostrou que os embriões irradiados com UV-A e UV-B apresentaram menos células em divisão em relação ao controle. Esse resultado, quando avaliado juntamente com a proteína p53, mostra que os embriões irradiados com UV-A tiveram a expressão dessa proteína aumentada em duas vezes quando comparada ao controle. O atraso no ritmo de desenvolvimento dos embriões irradiados com UV-A na idade 1, associado ao aumento da proteína p53, pode sugerir que p53 está atuando nessas células visando o reparo dos danos, pois em situações de estresse, a célula pode ficar retida por um longo período em G1. A proteína p53 estimula mecanismos essenciais para o desenvolvimento normal, como proliferação, diferenciação e apoptose, sendo regulada a nível transcricional, traducional e pós-traducional. Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, p53 induz a apoptose (Danilova *et al.*, 2008).

Altas doses de radiação UV induzem a fosforilação de p53 na ser46 a qual promove a expressão de p53AIP1 (do inglês, *p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1*), uma via pró-apoptótica que dissipa a mitocôndria através do gradiente eletroquímico da membrana interna (Oda *et al.*, 2000). Por outra via, p53 pode translocar-se para a

mitocôndria e interagir com membros da família Bcl2, a fim de induzir Bak e/ou Bax a permeabilizar a membrana mitocondrial (Leu *et al.*, 2004).

A expressão da proteína Bak nos embriões irradiados foi menor que no controle, sugerindo que essa proteína não esteja atuando na permeabilização da membrana mitocondrial, induzida por p53 na via apoptótica intrínseca. Por outro lado, a proteína caspase 8, ativadora da apoptose na via extrínseca, foi consideravelmente expressa nos embriões na idade 1, nos grupos irradiados com UV-A e UV-B. A via extrínseca da apoptose é responsável pela eliminação de células excedentes durante o desenvolvimento, maturação do sistema imune e eliminação de tumores (Ashkenazi e Dixit, 1998). Nesta via, caspase 8 é recrutada e cliva a caspase 3, efetora da apoptose, que também pode ser clivada pela caspase 9 na via intrínseca apoptótica. Nossos dados mostram que a proteína caspase 3 diminuiu nos grupos UV-A e UV-B quando comparado ao controle, indicando a ocorrência de estresse celular, sem, contudo levar a apoptose.

Os níveis da proteína Hsp70 induzível por estresse, tanto nos grupos irradiados com UV-A e UV-B como no controle foram similares, mostrando não haver atividade induzida por estresse celular nesta idade. Bonaventura *et al.* (2005; 2006) analisou a expressão dessa proteína no desenvolvimento de ouriços do mar em idades iniciais e seus dados mostraram que os níveis da proteína Hsp70 são rapidamente elevados após o estresse causado pela radiação UV-B e que a regulação da Hsp70 não ocorre a nível transcricional, o que não foi observado nesta idade.

5.2 Efeitos da radiação UV na idade 2

Na idade 2, a frequência de alterações morfológicas externas aumentou, inclusive no grupo controle, porém os grupos UV-A e UV-B apresentaram uma porcentagem de alterações maior que o controle e UV-B+UV-A. A alteração que foi mais proeminente em todos os grupos foi a pigmentação branca nos olhos.

Na idade 2, a presença da pigmentação do olho já pode ser observada, indicando a formação desta estrutura. Assim, foi realizada a análise do índice do olho, que reflete o grau de desenvolvimento de estruturas internas. Essa relação já foi descrita para *M. olfersi* por Simões-Costa *et al.* (2005). Apesar do índice do olho ser considerado uma importante característica morfológica, alterações deste índice nos

embriões irradiados, tanto na idade 2, quanto na idade 3, não foram registradas, sugerindo que as estruturas internas mantiveram seu padrão de desenvolvimento, mesmo quando expostas às irradiação UV.

De maneira geral, a quantidade de água nos ovos foi maior somente no grupo UV-B+UV-A e esse grupo também apresentou mais embriões com atraso no ritmo do desenvolvimento que os grupos UV-A e UV-B. No entanto, a proteína p53 no grupo UV-B+UV-A foi menor em relação ao controle. A proliferação celular nesta idade foi maior no grupo UV-B e principalmente no grupo UV-B+UV-A. O atraso do ritmo do desenvolvimento no grupo UV-B+UV-A, relacionado com o aumento da quantidade de água e da proliferação celular, aparentemente não bloqueada pela p53, mostra que o desenvolvimento está prosseguindo dentro de uma aparente normalidade.

Os níveis de caspases 8 e 3 nesta idade foram semelhantes nos grupos irradiados e no controle. Esses dados sugerem que a irradiação UV-A, após a irradiação UV-B, recupera os danos causados pelas radiações UV isoladas, pois as alterações morfológicas externas neste grupo foram iguais as do controle. A taxa apoptótica reduzida nos grupos UV-A e UV-B pode gerar mais alterações externas, visto que os embriões apresentaram mais sinais de danos celulares, como o aumento da caspase 8 e Bak, sem maior expressão das proteínas Bcl2 e Hsp70.

O conjunto de informações de resultados obtidos na idade 2 parece indicar que esta idade representa um período de ajuste dos processos celulares, onde observa-se variações significativas dos níveis das proteínas, que tendem a se ajustar ao longo da idade 3.

5.3 Efeitos da radiação UV na idade 3

Na idade 3, os dados biométricos não apresentaram alterações e o atraso no ritmo do desenvolvimento não é mais expressivo. A proteína p53 está presente somente nos grupos irradiados, principalmente no grupo UV-A e UV-B. Esses resultados indicam que nesta idade, onde os embriões já estão bem desenvolvidos e prestes a eclodirem, a p53 deixa de atuar no desenvolvimento normal do embrião e passa a ter função sinalizadora de estresse. Porém, nesta idade, o mecanismo de parada do ciclo celular para fins de reparos também não está mais ativo, como observado principalmente na idade 1. Em consequência, as alterações morfológicas externas nesta idade estão elevadas, principalmente nos grupos irradiados, tendo embriões com mais de um tipo de alteração, principalmente nas estruturas embrionárias, como o olho e o

cromatóforo. A elevada alteração nos cromatóforos mostra que esta estrutura, conhecida por absorver a radiação UV e proteger o embrião, pode estar sendo prejudicada por ainda não terem a capacidade de atuar nesse processo. Observou-se que a caspase 3 está elevada somente no grupo UV-A nesta idade, este dado reforça a idéia de que a falta de apoptose pode levar ao aumento de alterações morfológicas externas.

Na idade 3, a Hsp70 está elevada nos grupos irradiados e ausente no controle, mostrando sua atividade de proteção celular diante de um estressor.

A proteína Bcl2 na idade 3 está aumentada no grupo UV-A, sugerindo que nesta idade esta proteína possui uma maior atividade. A presença da proteína Bak foi similar entre os grupos UV-B, UV-B+UV-A e controle, e elevada no grupo UV-A. Bak pode ser observada em todos os grupos e nas três idades provavelmente porque Bak e Bax participam da dinâmica morfológica mitocondrial em células normais, balanceando os processos de fissão e fusão. Bak interage com proteínas de fusão mitocondrial, as mitofusinas (Mfn1 e Mfn2) e durante a apoptose a Bak se dissocia de uma proteína de fusão mitocondrial e se associa à outra, ocorrendo assim, a fragmentação mitocondrial, evento que precede a ativação da caspase (Frank *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001; Okamoto e Shaw, 2005; Karbowski *et al.*, 2006). O estudo de Suyama *et al.* (2002) mostrou que a Bak pode levar à apoptose via TNF (do inglês, *Tumor necrosis factor*) independentemente da presença da caspase 3, processo que em nossos estudos poderia estar acontecendo na idade 2, onde os grupos UV-A e UV-B apresentaram aumento de Bak, sem aumento da caspase 3.

As proteínas da família Bcl2 foram encontradas em diferentes organelas celulares. As proteínas Bax e Bid foram localizadas no RE e no envelope nuclear (Gajkowska *et al.*, 2004), a proteína Bcl2 está presente na membrana externa mitocondrial, na membrana nuclear e no RE (Monaghan *et al.*, 1992; Krajewski *et al.*, 1993; Lithgow *et al.*, 1994) e Bak, na membrana externa mitocondrial e no RE (Wei *et al.*, 2001, Nutt *et al.*, 2002; Zong *et al.*, 2003). Observamos na nossa pesquisa, através da técnica de imuno-histoquímica, que a proteína Bak está localizada no núcleo celular. As proteínas pró-apoptóticas de multidomínios BH, como a Bak, são estruturalmente similares entre si e às proteínas anti-apoptóticas (Adams e Cory, 1998; Suzuki *et al.*, 2000) e também assemelham-se por possuírem um domínio transmembrana no terminal COOH, que faz com que essas proteínas se integrem facilmente na bicamada lipídica das membranas, o que ajuda a direcioná-las para as membranas intracelulares (Chen-Leavy e Cleary, 1990). Por estas

características, é bem possível que a proteína Bak possa estar também presente na membrana nuclear, confirmando nossos resultados.

A presença destas proteínas no núcleo, no RE e na mitocôndria, levou os pesquisadores a investigarem os mecanismos que justificam esta disposição. Resultados ultra-estruturais e de imunocitoquímica demonstraram que a mitocôndria e o RE são interconectados fisicamente e fisiologicamente, afetando o metabolismo mitocondrial e alguns processos celulares (Gajkowska *et al.*, 2004). Trabalhos têm demonstrado que proteínas de multidomínios da família Bcl2 são capazes de afetar o fluxo de cálcio (Ca^{2+}) via retículo endoplasmático - mitocôndria (Wei *et al.*, 2001, Nutt *et al.*, 2002; Zong *et al.*, 2003).

O RE ativa a apoptose em resposta aos fatores que interferem no seu funcionamento, como o fluxo de cálcio, que levam a produção de proteínas com alteração no processo de dobramento. Estas proteínas acabam acumulando-se e agregando-se no RE, causando um estresse que pode levar a ativação da apoptose via caspase 12 (Kaufman, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000).

Zong *et al.* (2003) observou que as proteínas Bax/Bak podem também estar envolvidas na ativação da apoptose via RE, pois a falta de cálcio levou ao estresse no RE, induzindo mudanças conformacionais e a oligomerização de Bax e Bak na membrana do RE, a clivagem específica das caspases 12 e a morte celular. Gajkowska *et al.* (2004) observou que Bax e Bid localizados no RE, mitocôndria e núcleo medeiam a ligação entre RE e mitocôndria, e estão envolvidos na coordenação da sinalização do cálcio e apoptose. As proteínas Bax e Bid fariam com que o cálcio do RE diminuísse, levando a mudanças nos níveis de cálcio na mitocôndria, o que contribuiria para a liberação do citocromo c, que é dependente do fluxo de cálcio, e a morte celular. Trabalhos anteriores deste grupo mostraram que Bax e Bid translocam-se da mitocôndria, do RE e do envelope nuclear e interagem com outros componentes para formar poros e promover a liberação do citocromo c da mitocôndria, em resposta a estímulos apoptóticos (Godlewski *et al.*, 2001; 2002; Gajkowska e Wojewodzka, 2002, Kolek *et al.* 2003). Já a proteína Bcl2 tem sido considerada como estabilizadora do gradiente de cálcio entre o citoplasma e o RE e entre o citoplasma e o núcleo, através de formação de poros na membrana, suprimindo a apoptose. Esta capacidade da proteína Bcl2 pode fornecer uma base comum para a função de Bcl2 em diferentes compartimentos subcelulares (Lam *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 1996).

A regulação do cálcio nessas três organelas provavelmente está relacionada com a função dos membros da família Bcl2, sugerindo que

as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas possuem funções distintas e separadas (Brown, 1997).

5.4 Dímeros de pirimidina

Na célula, a radiação UV-B é absorvida pelo DNA podendo formar fotoprodutos de DNA, como CPD, (6-4) PP e ligações entre proteínas e o DNA. Esses fotoprodutos podem iniciar na célula respostas contra o estresse (Batista, *et al.*, 2009; Boesch *et al.* 2011). A quantificação dos CPD através do ensaio do cometa é uma das ferramentas mais utilizadas nas pesquisas com radiação UV-B para verificar os danos ao DNA. Esta técnica permite a detecção de imunofluorescência dos CPD e (6-4) PP no DNA de células isoladas (Sauvaigo *et al.*, 1998). No nosso trabalho a investigação da presença de dímeros de pirimidina no DNA foi realizada por imuno-histoquímica, porém não foi possível detectar a presença de dímeros através desta técnica, em nenhum dos grupos experimentais.

No entanto, experimentos de Brenneisen *et al.* (2002) com células anucleadas demonstraram que existe uma outra resposta à radiação UV-B que não é dependente do núcleo. Este estudo mostra a importância de realizar outras técnicas para a verificação dos danos causados pela radiação UV, visto que eles não ocorrem somente a nível nuclear.

5.5 Fotorreativação da radiação UV-A

Estudos sobre a fotorreativação da radiação UV-A foram realizados em animais aquáticos expostos à radiação UV (Applegate e Ley, 1988; Dong *et al.*, 2008) e nesses estudos foi observado esse reparo em relação aos CPD (Applegate e Ley, 1988), eclosão, malformação, mortalidade e padrão vascular (Naganuma *et al.*, 1997; Lacuna e Uye, 2001; Dong *et al.*, 2007; 2008). Dong *et al.*, 2008 observou que a fotorreativação de UV-A foi mais efetiva durante o estágio de gástrula em embriões de zebrafish e menos efetiva em fases anteriores ou estágios posteriores.

Nossos experimentos mostraram que na maioria dos casos, UV-A imediatamente após a radiação UV-B, recuperou as alterações moleculares causadas pelas radiações UV-A, assim como pela UV-B, utilizadas separadamente. Em alguns casos, onde não foi observada essa

fotorreativação, as proteínas também não variaram quando comparado ao controle.

Naturalmente, os organismos estão expostos a determinados níveis da radiação UV-A e UV-B, no entanto a depleção da camada de ozônio está fazendo com que aumente os níveis da radiação UV-B na superfície terrestre sem o aumento proporcional da radiação UV-A e luz visível, envolvidas na fotorreativação e fotorreparo do DNA (Smith e Baker, 1989; Lesser *et al.*, 2001).

De um modo geral, a radiação UV não inviabilizou os embriões de *M. olfersi* e as alterações morfológicas externas foram mais frequentes em embriões nas idades 2 e 3, em estruturas que aparentemente não comprometem os embriões. Foi observado atraso no ritmo do desenvolvimento nos embriões irradiados, sendo mais eminente nas idades 1 e 2. Este atraso no ritmo do desenvolvimento pode estar relacionado com o aumento da proteína p53 nos embriões irradiados com UV-A na idade 1. Entretanto, o aumento dessa proteína nos embriões irradiados na idade 3, pode estar relacionado com a indução de estresse pela radiação UV, assim como a proteína Hsp70, que também foi maior em todos os grupos irradiados nesta idade e, a ausência destas proteínas no grupo controle na idade 3 fundamenta esta hipótese.

O padrão de proliferação celular nos embriões parece não ser afetado pela radiação UV e somente o grupo UV-B na idade 1 apresentou diminuição da proliferação celular. No entanto, a radiação UV causou o aumento da proteína caspase 8 em embriões nas três idades dos grupos irradiados com UV-A e UV-B, e no grupo UV-B+UV-A, apenas nos embriões na idade 3. Essa expressão aumentada da proteína caspase 8 mostra que realmente está ocorrendo um estresse pela radiação UV e que esse estresse pode ativar a via extrínseca apoptótica.

A radiação UV interferiu na expressão da proteína caspase 3 nos embriões irradiados com UV-A e UV-B+UV-A, onde ocorreu uma diminuição na idade 1 de ambos e aumento na idade 3 do grupo UV-A. A variação desta proteína efetora apoptótica, mostra que a radiação UV é capaz de interferir no padrão apoptótico dos embriões.

A proteína Bak foi mais expressa na idade 2 dos embriões irradiados com UV-A e UV-B, e na idade 3 do grupo UV-A, mostrando que possivelmente a radiação UV também pode ativar a via intrínseca apoptótica. A expressão aumentada da proteína Bcl2 na idade 1 do grupo UV-B e na idade 3 do grupo UV-A, indica um possível bloqueio das proteínas pró-apoptóticas. No entanto ela foi menor nos grupos UV-

B+UV-A idade 1 e 2, e no grupo UV-A idade 2, onde Bak estava aumentada.

Estes resultados mostram que a radiação UV possa ativar nos embriões irradiados tanto a via apoptótica extrínseca, quanto a via intrínseca, ou ainda, ativar a via extrínseca e através da mediação com a caspase 8, ativar a via intrínseca, ocorrendo a subsequente clivagem da proteína BID (Gross *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 1998), que induz as proteínas Bax e/ou Bak à atuarem na membrana mitocondrial (Wang, 2001).

Em relação à fotorreativação pela radiação UV-A, foi observado que ocorre uma recuperação dos danos causados pela radiação UV nos embriões irradiados com uma dose suplementar de UV-A. No entanto, seria necessário realizar técnicas complementares que mostrassem se os elementos dos mecanismos de reparo estão ativos, como a proteína fotoliase, induzida pela radiação UV-A.

Nossa pesquisa abrangeu todo o período embrionário do camarão *M. olfersi*, agrupados em três idades e os efeitos morfológicos e celulares das radiações UV-A e UV-B isoladas e UV-B seguido pela UV-A por um tempo suplementar, a fim de reconhecer possíveis reparos induzidos pela radiação UV-A. Este trabalho também demonstrou que o camarão *M. olfersi* é um bom modelo para estudos sobre a radiação UV, considerando o caráter conservativo dos mecanismos celulares.

Seria interessante realizar mais pesquisas sobre as radiações UV, devido os reconhecidos efeitos nocivos que essa radiação pode ter sobre as células, moléculas e no ambiente como um todo. Não menos relevantes são os estudos com embriões de invertebrados do ambiente aquático, visto que essa fase da vida é pouco pesquisada, embora tenha grande sensibilidade aos estressores como a radiação UV, a qual eles estão expostos durante todo o seu ciclo de vida. Poderia para esse fim, ampliar e detalhar os resultados obtidos neste trabalho, utilizando outros marcadores de vias apoptóticas e outras técnicas, como por exemplo, a técnica de *imunogold* em microscopia eletrônica para confirmar a presença da proteína Bak no núcleo, assim como Monaghan *et al.* (1992), Lithgow *et al.* (1994), Zong *et al.* (2003) e Gajkowska *et al.* (2004) realizaram em seus estudos, e *Real-time* PCR para avaliar a regulação à nível transcricional das proteínas de estresse celular e nuclear, utilizadas neste estudo, assim como outras proteínas envolvidas no desenvolvimento.

5.6 Considerações finais

Nossos resultados sobre os efeitos da radiação UV nos camarões *M. olfersi* mostraram que as alterações morfológicas externas observadas nos embriões, não foram capazes de inviabilizá-los durante o desenvolvimento.

O atraso no ritmo do desenvolvimento ocorreu nos embriões irradiados nas idades iniciais, talvez induzidos pela proteína p53, a fim de reparar danos celulares e nucleares ocorridos nos embriões expostos à radiação UV.

A proliferação celular nos embriões irradiados em geral não é afetada pela radiação UV, o que pode estar relacionado com a viabilidade desses embriões.

A radiação UV interferiu na regulação das proteínas de estresse celular no final do período embrionário e nas proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas durante todo o desenvolvimento embrionário.

O conjunto de resultados da idade 2, incluindo o controle, demonstrou que esta idade representa um período crítico, onde ocorrem variações dos processos celulares, que tendem a se ajustarem durante a idade 3.

O camarão *M. olfersi* é um bom modelo para estudos sobre a radiação UV, considerando o caráter conservativo dos mecanismos celulares.

Por fim, a radiação UV-A parece realmente atuar no processo de fotorreativação celular, recuperando danos nos embriões expostos à radiação UV.

6. Referências bibliográficas

- Adams, J.M., Cory, S. 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*, 281:1322-1326.
- Alberts, B., *et al.* 2010. *Biologia Molecular sa Célula*. Artmed Editora S.A, 5º edição. 1396p.
- André, I.R.N., Ferreira, N.J., Conforte, J.C. 2003. Análise do comportamento do ozônio estratosférico na América do Sul e vizinhanças utilizando-se imagens do satélite NIMBUS7/TOMS. INPE, 1117-1124.
- Applegate, L.A., Ley, R.D. 1988. Ultraviolet radiation-induced lethality and repair of pyrimidine dimers in fish embryos. *Mutat. Res.*, 198(1):85-92.
- Araujo, H., Bier, E. 2000. *sog* and *dpp* exert opposing maternal functions to modify Toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development*, 127:3631-3644.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281:1305-1308.
- Ban, S. *et al.* 2007. Effect of solar ultraviolet radiation on survival of krill larvae and copepods in the Antarctic Ocean. *Polar Biol.*, 30:1295–1302.
- Bancroft, B.A., Baker, N.J., Blaustein, A.R. 2007. Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecol. Lett.*, 10:332–345.
- Batista, L.F.Z. *et al.* 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mut. Res.*, 681:197–208.
- Beçak, W.J., Paulete. 1976. *Técnicas de citologia e histologia*. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro.
- Blaustein, A.R., Belden, L.K. 2003. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. *Evo. Devo.*, 5:(1)89–97.

- Boatright, K.M., Salvesen, G.S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:725–731.
- Boesch, P. *et al.* 2011. DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813:186–200.
- Bonaventura, R. *et al.* 2005. UVB radiation prevents skeleton growth and stimulates the expression of stress markers in sea urchin embryos. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 328:150–157.
- Bonaventura, R. *et al.* 2006. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Mar. Biol.* 149:79–86.
- Brenneisen, P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. 2002. Ultraviolet-B-irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 973:31–43.
- Brown, R. 1997. The bcl-2 family of proteins. *Brit. Med. Bull.*, 53(3):466-477.
- Cadet, J., Sage, E., Douki, T. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res.*, 57:3–17.
- 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.
- Charron, R.A. *et al.* 2000. Ultraviolet-B Radiation Effects on Antioxidant Status and Survival in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Photochem. Photobiol.*, 72(3):327–333.
- Chen-Leavy, Z., Cleary, M.L. 1990. Membrane topology of the bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J. Biol. Chem.*, 265:4929-4933.
- Cory, S., Adams, J.M. 2002. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2:647-656.

- Crutzen, P.J. 1974. Estimates of Possible Variations in Total Ozone Due to Natural Causes and Human Activities. *Ambio*, 3(6):201-210.
- Cryns, V., Yuan, J., 1998. Proteases to die for. *Gene. Dev.*, 12:1551–1570.
- Dahms, H., Song-lee, J. 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat. Toxicol.*, 97:3–14.
- Damian, D.L., Halliday, G.M., Barnetson, R.S. 1997. Broad-spectrum sunscreens provide greater protection against ultraviolet radiation-induced suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans. *J. Invest. Dermatol.*, 109(2):146-51.
- Dang, W. *et al.* 2010. Identification and molecular analysis of a stress-inducible Hsp70 from *Sciaenops ocellatus*. *Fish Shellfish Immun.*, 29:600-607.
- Danilova, N., Sakamoto, K.M., Lin, S. 2008. p53 family in development. *Mech. Dev.*, 125(11-12):919-31.
- Desagher, S., Martinou, J. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Cell Biol.*, 10:369-377.
- Díaz, S. *et al.* 2006. Ozone and UV radiation over Southern South America: climatology and anomalies. *Photochem. Photobiol.*, 82:834-843.
- Diffey, B.L. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Rev. Phys. Med. Biol.*, 36(3):299-328.
- Diffey, B.L. 2002. What is light? *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.*, 18:68-74.
- Dong, Q. *et al.* 2007. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: Evidence for competent photorepair system. *J. Photochem. Photobiol.*, 88:137–146.
- Dong, Q. *et al.* 2008. UVA induced photo recovery during early zebrafish embryogenesis. *J. Photoch. Photobio. B.*, 93:162–171.

- El-Bakary, Z.A., Sayed, A.E.H. 2011. Effects of short time UV-A exposures on compound eyes and haematological parameters in *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Ecotoxicol. Environm. Safety*, 74(4):960-6.
- Evan, G., Littlewood, T. 1998. A matter of life and cell death. *Science*, 281:1317-1322.
- Farman, J.C., Gardiner, B.G., Shanklin, J.D. 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*, 315:207-210.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology *Annu. Rev. Physiol.* 61:243–82.
- Frank, S. *et al.* 2001. The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Dev. Cell*, 1(4):515-525.
- Freere, R.H., Weibel, E.R. 1967. Stereologic techniques in microscopy. *J. R. Microscop. Soc.*, 87:25-34.
- Gajkowska, B., Wojewodzka, U. 2002. A novel immunoelectron embedment free electron microscopy reveals association of apoptosisregulating proteins with subcellular structures. *Histochem. J.* 34:441–446.
- Gajkowska, B. *et al.* 2004. Translocation of Bax and Bid to mitochondria, endoplasmic reticulum and nuclear envelope: possible control points in apoptosis. *J. Mol. Histol.*, 35(1):11-9.
- Godlewski, M.M. *et al.* 2001. Subcellular redistribution of BAX during apoptosis induced by anticancer drugs. *Colloq. Inse.*, 12:607–617.
- Godlewski, M.M. *et al.* 2002. Colocalization of BAX with BID and VDAC-1 in nimesulideinduced apoptosis of human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Colloq. Inse.*, 13:1–14.

- Gouveia, G.R. *et al.* 2004. Ultraviolet radiation induces dose-dependent pigment dispersion in crustacean chromatophores. *Pigment Cell Res.*, 17:545-548.
- 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, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene. Dev.*, 13:1899-1911.
- Häder, D.P. *et al.* 2003. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2:39-50.
- Häder, D.P., Sinha, R.P. 2005. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutat. Res.*, 571:221-233.
- Häder, D.P. *et al.* 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6:267-285.
- Hemavathy, K., Meng, X., Ip, Y.T. 1997. Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development*, 124:3683-3691.
- Hamer, B. *et al.* 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environ. Int.*, 30:873- 882.
- Henzel, M.J. *et al.* 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6):348-60.
- Holthuis, L.B. 1980. FAO Species Catalogue. Shrimps and prawns of the world. FAO Fisheries Synopsis. Rome. 125(1):1-126.

- Igney, F.H. e Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 277-288.
- Karbowski, M. *et al.* 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, 443:658-662.
- Kaufman, R.J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.*, 1999 13:1211-1233.
- Kelner, A. 1949. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultra-violet irradiation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 35:73-79.
- 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.* *Aquatic., 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.
- Kirchhoff, V.W.J.H. *et al.* 1996. Evidence for an Ozone Hole Perturbation at 30° South. *Atmos. Environ.*, 30(9):1481-1488.
- Kirchhoff, V., Leme, P.L. 2006. Buraco na camada de ozônio. *Coleção Explorando o ensino: O Brasil e o meio ambiente antártico*, 10:51-54.
- Kolek, O. *et al.* 2003. Colocalization of apoptosis regulating proteins in mouse mammary epithelial HC11 cells exposed to TGF- β 1. *Eur. J. Cell Biol.*, 82:303–312.
- Krajewski, S. *et al.* 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.*, 53(19):4701-14.

- Krutmann, J. 2000. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J. Dermatol. Sci.*, 23(1):22–26.
- Krutmann, J. 2006. The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signaling. *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 92:105–107.
- 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. 2000. Effect of UVB radiation on the survival, feeding, and egg production of the brackish-water copepod, *Sinocalanus tenellus*, with notes on photoreactivation. *Hydrobiologia*, 434:73–79.
- 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.
- Lam, M. *et al.* 1994. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:6569-6573.
- Leahy, S. 2006. Restaurar o ozônio no Pólo Sul vai demorar 60 anos. *Terramérica: Projeto de comunicação dos Programas das Nações Unidas para o Meio Ambiente (Pnuma) e para o Desenvolvimento (Pnud)*. Disponível em: <<http://envolverde.com>>. Acessado em: 24 março 2010.
- Lesser, M.P., Farrell, J.H., Walker, C.W. 2001. Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *J. Exp. Biol.*, 204:157-164.
- Lesser, M.P. *et al.* 2006. Biological weighting functions for DNA damage in sea urchin embryos exposed to ultraviolet radiation. *J. Expe. Mar. Biol. Ecol.*, 328:10–21.

- Letai, A. *et al.* 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2:183-192.
- Leu, J.I. *et al.* 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.*, 6:443-450.
- Li, P. *et al.* 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91:479–489.
- Li, H. *et al.* 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*, 94:491–501.
- Lithgow, T. *et al.* 1994. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ.*, 5:411-417.
- Malloy, K.D. *et al.* 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton. *Ecology*, 94:1258-1263.
- Marin, M.C. *et al.* 1996. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. *Oncogene.*, 12(11):2259-66.
- Matallana-Surget, S. *et al.* 2010. Influence of growth temperature and starvation state on survival and DNA damage induction in the marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 100:51–56.
- Maverakis, E. *et al.* 2010. Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.*, 34:247-257.
- Mckenzie, L.R. *et al.* 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6:218–231.

- Merry, D.E., Korsmeyer, S.J. 1997. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:245–67.
- Miguel, N.C.O., Meyer-Rochow, V.B., Allodi, S. 2002. Ultrastructural study of first and second order neurons in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Micron*, 33:627-637.
- Miguel, N.C.O. *et al.* 2007. Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell Tissue Res.*, 329:159-168.
- Miner, B.G., Morgan, S.G., Hoffman J. R. 2000. Postlarval chromatophores as an adaptation to ultraviolet radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 249(2):235-248.
- Molina, M.J., Rowland, F.S. 1974. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature*, 249:810-812.
- Monaghan, P. *et al.* 1992. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.*, 40(12):1819-25.
- 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., Dib, A., Nazari, E. 2004. Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar and post-naupliar periods. *Rev. Bras. Zool.*, 21(1):27-32.
- Müller, Y.M.R. *et al.* 2007. Morphology and chronology of embryonic development in *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea, Decapoda). *Invert. Reprod. Dev.*, 50(2):67–74.
- Muraca, P., Stout, J.E., Yu, V.L. 1987. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing legionella pneumophila within a model plumbing system. *Appl. Environm. Microbiol.*, 53:447-453.

- Muzio, M. *et al.* 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85:817–827.
- Naganuma, T., Inoue, T., Uye, S. 1997. Photoreactivation of UV-induced damage to embryos of a planktonic copepod. *J. Plankt. Res.*, 19(6):783-787.
- Nahon, S. *et al.* 2011. Can UV radiation affect benthic deposit-feeders through biochemical alteration of food resources? An experimental study with juveniles of the benthic polychaete *Eupolyornia nebulosa*. *Mar. Environ. Res.*, 71(4):266-74.
- Nakagawa, T. *et al.* 2000. Caspase-12 mediates endoplasmicreticulum-speci@c apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 403:98-103.
- 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. *et al.* 2010. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquat. Toxicol.*, 98(1):25-33.
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 8:299-306.
- Nigel, D.P., Gwynn-Jones, D. 2003. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends Ecol. Evol.*, 18(1):48-55.
- Nutt, L.K. *et al.* 2002. Bax and Bak Promote Apoptosis by Modulating Endoplasmic Reticular and Mitochondrial Ca^{2+} Stores. *J. Biol. Chem.*, 277(11): 9219–9225.
- Oda, K. *et al.* 2000. p53AIP1, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated p53. *Cell*, 102:849-862.

- 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.
- Okamoto, K., Shaw, J.M. 2005. Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 39:503-36.
- Olson, M.H., Mitchell, D.L. 2006. Interspecific Variation in UV Defense Mechanisms Among Temperate Freshwater Fishes. *Photoch. Photobiol.*, 82:606-610.
- Peak, M.J., Peak, J.G. 1990. Hydroxyl radical quenching agents protect against DNA breakage caused by both 365-nm UVA and by gamma radiation. *Photochem. Photobiol.*, 51(6):649-52.
- Perkins, H.C. 1972. Developmental rates at various temperatures of embryos of the northern lobster (*Homarus americanus* Milne – Edwards). *Fish. Bull.*, 70:95-99.
- Protocolo de Quioto. 1998. Editado e traduzido por: Ministério da Ciência e Tecnologia com o apoio do Ministério das Relações Exteriores da República Federativa do Brasil. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0012/12425.pdf>. Acessado em: 24 março 2010.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G. 2000. Crustaceans as Bioindicators. In Gerhardt, A. (Hrsg.) *Biomonitoring of Polluted Water – Reviews on Actual Topics*, Trans Tech Publications – Scitech Publications, Ütikon-Zürich, *Environm. Res. Forum*, 9:161-194.
- Rowland, F.S. 2006. Stratospheric ozone depletion. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361:769-790.
- Sanders, B.M., Martin, L.S. 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Sci. Total Environ.*, 139-140:459-70.

- Sauvaigo, S. *et al.* 1998. Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Anal. Biochem.*, 259:1-7.
- Schaumburg, L.G. *et al.* 2010. Ultraviolet radiation-induced genotoxic effects in the broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*. *Mutat. Res.*, 700:67–70.
- Schenk, M. *et al.* 2011. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: Study of cell injury by flow cytometry. *LWT - Food Sci. Technol.*, 44:191-198.
- Schmitt, A. *et al.* 2002. Histone H3 phosphorylation during *Xenopus* oocyte maturation: regulation by the MAP kinase/p90Rsk pathway and uncoupling from DNA condensation. *FEBS Letters*, 518:23-28.
- Schuch, A.P., Menck, C.F.M. 2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 99:111–116.
- Schuler, M., Green, D.R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. T.*, 29(6):684-688.
- Selvakumar, S., Geraldine, P. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comp. Biochem. Phys. A*, 140:209– 215.
- 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.
- Sinha, R.P., Häder, D.P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1:225–236.

- Smith, R.C. *et al.* 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science*, 225(5047):952-959.
- Smith, R.C. *et al.* 1992. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science*, 255(5047):952-959.
- Somosy, Z. 2000. Radiation response of cell organelles. *Micron*, 31:165-181.
- Suyama, E., Kawasaki, H. Taira, K. 2002. Identification of a caspase 3-independent role of pro-apoptotic factor Bak in TNF-K-induced apoptosis. *FEBS Letters*, 528:63-69.
- Suzuki, M., Youle, R.J., Tjandra, N. 2000. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell*, 103:645-654.
- Tao Y. *et al.* 2010. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere*, 78:541-547.
- Teixeira, R.L., Sá, H.S. 1998. Abundância de Macrocrustáceos Decápodos nas áreas rasas do Complexo Lagunar Mundaú/Manguaba, AL. *Rev. Brasil. Biol.*, 58(3):393-404.
- Toussaint, M., Wellinger, R.J., Conconi, A. 2010. Differential participation of homologous recombination and nucleotide excision repair in yeast survival to ultraviolet light radiation. *Mutat. Res.*, 698:52-59.
- Vázquez, M. e Hanslmeier, A. 2006. Ultraviolet radiation in the solar system. Springer, 380.
- VanHook, A.M., Patel, N.H. 2008. Crustacean. *Curr. Biol.*, 18(13):547-550.
- Van Hooser, A. *et al.* 1998. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J. Cell Sci.*, 111:3497-3506.

- Vaseva, A.V., Moll, U.M. 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787:414–420.
- Vega, R.L., Epel, D. 2004. Stress-induced apoptosis in sea urchin embryogenesis. *Mar. Environm. Res.*, 58:799–802.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Gene Dev.* 15:2922–2933.
- Webb, A.R., Holick, M.F. 1988. The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Ann. Rev. Nutr.*, 8:375-99.
- Wei, Y. *et al.* 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7480–7484.
- Wei, Y. *et al.* 1999. Phosphorylation of Histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 97:99–109.
- Wei, M.C. *et al.* 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Gene Dev.* 14:2060–2071.
- Wei, M.C. *et al.* 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292:727-730.
- Workman, J.L., Kingston, R.E. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67:545–79.
- Zepp, R.G. *et al.* 2007. Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6:286–300.
- Zong, W. *et al.* 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.*, 162(1):59-69.

Sites acessados:

cienciadiaria.com.br

www.biorede.pt

www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash