

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Efeitos da exposição crônica à radiação ultravioleta no sistema visual do
caranguejo *Neohelice granulata***

Biólogo Valmor Vinicius Araujo Vaz

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Alves Vargas e co-orientação do Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery.

Rio Grande, Julho de 2017.

Agradecimentos

Não tem outro jeito de começar a não ser agradecendo à quem me capacitou para a conclusão desta etapa importante da minha vida. Obrigado Senhor Jesus pelo teu amor e fidelidade.

Voltar para a universidade após quase 5 anos afastado não foi nada fácil, mas a vontade de fazer dar certo foi maior que tudo. Por isto, ao final desta etapa, chego com o sentimento do dever cumprido e a certeza que cresci profissionalmente, e que valeu a pena cada segundo.

Cada objetivo, seja pessoal ou profissional, é compartilhado com pessoas, que de uma forma ou outra, contribuem e muito para a realização dos nossos sonhos. Sendo assim, não tinha como acabar sem estar agradecendo pessoas que foram importantes em cada momento desta minha caminhada.

Quero agradecer do mais fundo do meu coração à minha amada esposa Fernanda e ao nosso bem mais precioso que é o nosso filho Miguel. Se hoje chego neste momento, foi por todo o apoio, carinho e dedicação que me demonstraste em todos os momentos que passamos juntos. Te amo para todo sempre.

Quero agradecer aos meus pais (Valmor e Lucia) e irmãos (Tati e Alex), pois sem o apoio, amor e dedicação de vocês eu tenho a certeza que chegar neste momento seria muito mais difícil. Obrigado Pai e Mãe por tudo que me deram e que fizeram e fazem até hoje por mim, pela única recompensa de me verem bem. Amo vocês.

Quero também deixar os meus agradecimentos aos meus sogros (Cláudio e Maria Helena) pela compreensão e apoio ao longo deste tempo. Além deles, estendo os meus agradecimentos aos meus cunhados (Mônica e Diego) pelo apoio dado.

Quero também aqui deixar o meu muito obrigado ao meu amigo, irmão, compadre e por fim orientador Marcelo Alves Vargas. Marcelinho, tu sabe que és muito mais que um simples orientador, és um profissional sem igual e em quem eu me espelho. Agradeço à Deus pela tua vida. Obrigado por toda a tua dedicação ao longo deste tempo, e quem imaginaria que após uma simples janta estaríamos aqui concluído esta etapa juntos. Como eu te falo, estou junto para o que tu precisar.

Quero agradecer a Renatinha, que além de ser a dinda do Miguel escolhida a dedo, é uma amiga fiel e uma pessoa que não nega ajuda. Renatinha, obrigado por toda a tua dedicação e pelo apoio que me deste em um momento complicado no lado pessoal. Estendo os meus agradecimentos aos pais (Ironi e Carmen), irmã (Vanessa), cunhado

(Júnior) e vó (Denir) do Marcelo por terem me acolhido como filho. Vocês moram no meu coração.

Agradeço a todas as pessoas que se envolveram neste projeto e que abraçaram junto comigo cada uma das etapas. Lembro das pessoas que permaneceram conosco, mas que por motivos variados seguiram outros caminho (Mariana e Diego), meu muito obrigado. Além deles, não poderia deixar de agradecer à Leandra Jardim que foi fiel e me acompanhou em cada momento, tanto nos ruins como nos bons. Leandra meus sinceros agradecimentos.

Quero agradecer ao professor Luiz Eduardo Maia Nery (Carioca) pelos “puxões” de orelha e por todas as discussões que tivemos ao longo destes dois anos. Carioca, obrigado pelos ensinamentos e aprendizado que me oportunizasse neste tempo.

Gostaria de agradecer a professora Dra. Silva Allodi, a professora Dra. Ana Paula Votto e a professora Dra. Daza Filgueira que aceitaram o convite para fazerem parte da banca deste trabalho e que tenho a certeza que contribuirão com esta dissertação.

Gostaria também de deixar o meu muito obrigado aos amigos da fisiologia, principalmente ao Juliano Barreto, Silvana Nunes, Fábio Tarouco e Robson Velasques pelos momentos de ajuda e por todos os outros momentos de descontração, que tornaram momentos pesados muito mais fáceis.

Gostaria de agradecer aos demais professores e ao Programa de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande que possibilitaram com que eu me construísse como pesquisador.

Enfim meu muito obrigado à todos que mesmo não citados, contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

Sumário

Resumo Geral.....	5
Abstract.....	6
1. Introdução geral.....	7
1.1 Radiação Ultravioleta.....	7
1.2 Efeito da radiação ultravioleta nos organismos.....	9
1.2.1 Efeitos da radiação UV no tegumento.....	9
1.2.2 Efeitos da radiação UV no sistema visual.....	11
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	12
1.3.1 Sistema de defesa antioxidante.....	14
1.4 Crustáceos.....	15
1.4.1 <i>Neohelice granulata</i>	16
1.5 Estrutura dos olhos dos crustáceos decápoda.....	17
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos.....	19
Manuscrito.....	21
Abstract.....	22
1. Introduction.....	23
2. Material and Methods.....	26
2.1. Animals collection and laboratory maintenance.....	26
2.2. Experimental design.....	26
2.3 Tissue preparation.....	26
2.4. Biochemical analysis.....	27
2.5 Biochemical and histological damages.....	28
2.6 Statistical analysis.....	29
3. Results.....	29
4. Discussion.....	32
5. Conclusion.....	37
6. Acknowledgements.....	37
7. References.....	38
Legend of figures.....	43
Figures.....	45
Discussão geral.....	52
Perspectivas.....	58
Conclusões.....	59
Bibliografia geral.....	60

Resumo geral

O espectro eletromagnético pode ser dividido em diferentes regiões, cujas características variam de acordo com o comprimento de onda. Deste, a radiação UV compreende uma pequena faixa, que varia de 100 até 400 nm. A ação antropogênica, através da liberação de compostos derivados dos clorofluorcarbonos (CFC's), vem provocando progressivamente a diminuição da camada de ozônio, acarretando no aumento da incidência da radiação UV, principalmente da radiação UVB, sobre a superfície terrestre. A radiação UV pode desencadear diferentes reações fotoquímicas e interações secundárias envolvendo, como por exemplo, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de ativar componentes do sistema imune, desencadeando respostas inflamatórias. O acúmulo de EROs no organismo pode ser prejudicial, pois pode levar a várias formas de modificações celulares, além da geração do estresse oxidativo. Os tecidos podem normalmente se defender contra os danos desencadeados pelas EROs através do uso de mecanismos específicos de redução destas, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Entre as enzimas que participam da defesa antioxidante podemos destacar a catalase (CAT) e a glutatona S-transferase (GST). Dos diferentes sistemas animais, o visual, está constantemente exposto à radiação UV. Os efeitos agudos da exposição à radiação UV sobre os tecidos mais expostos têm sido investigados. Entretanto, os efeitos da exposição crônica à radiação UV têm sido investigados com menos intensidade, principalmente no sistema visual. Neste sentido, investigamos os efeitos provocados pela exposição crônica da radiação UVB no sistema visual do caranguejo *Neohelice granulata*, através de análises bioquímicas e morfológicas na retina e lobo óptico. Os animais foram expostos à uma baixa dose ($0,09 \text{ J/cm}^2$) de radiação UVB por 1, 15, 30 ou 60 dias, enquanto o grupo controle foi exposto à luz visível pelos mesmos períodos amostrais. Na retina, observamos um aumento na concentração de EROs, na atividade da CAT e na atividade da GST após o primeiro dia de exposição à radiação UVB. Já após 15 dias de exposição, verificamos um aumento dos níveis de ACAP, uma diminuição da atividade da GST e uma diminuição dos níveis de LPO. No entanto, após 30 dias de exposição, nós observamos um aumento na concentração de EROs, uma diminuição dos níveis de ACAP e uma diminuição da atividade da CAT. Já após 60 dias, observamos um aumento dos níveis de ACAP. No lobo óptico, observamos, após o primeiro dia de exposição, um aumento na atividade da GST e uma diminuição dos níveis de LPO. Já com 15 dias de exposição, verificamos uma diminuição na concentração de EROs e um decréscimo na atividade da CAT. Já após 30 dias de exposição, observamos uma diminuição na atividade da CAT após exposição à radiação UVB. No entanto, após 60 dias, verificamos um aumento na concentração de EROs nos animais expostos quando comparados ao grupo controle. Na análise morfológica, observamos alterações após 60 dias de exposição, onde na retina, pudemos constatar um processo inflamatório, através da infiltração de hemócitos nesta região. Já na lobo óptico, observamos, após 60 dias de exposição, uma desorganização nos corpos celulares na medula externa. Sendo assim, podemos concluir que a exposição crônica à baixas doses da radiação UVB altera o *status oxidativo* do sistema visual do caranguejo *N. granulata*, porém o sistema de defesa parece estar atuando para proteger os tecidos da LPO desencadeadas pelas EROs. Além disto, mesmo não identificando dano de LPO, podemos verificar um processo inflamatório no sistema visual do *N. granulata*, o que mostra que existe um processo danoso desencadeado pela exposição crônica à radiação UV.

Palavras-chave: radiação UVB; crustáceos; espécies reativas de oxigênio; sistema de defesa antioxidante.

Abstract

The electromagnetic spectrum can be divided into different regions, whose characteristics vary according to the wavelength. The UV radiation comprises a small range, from 100 to 400 nm. The anthropogenic action, through the release of compounds derived from chlorofluorocarbons (CFC's), has been progressively causing a decrease in the ozone layer, leading to the increase of UV radiation incidence, mainly the UVB radiation, on the Earth's surface. The UV radiation can trigger different photochemical reactions and secondary interactions involving, for example, the generation of reactive oxygen species (ROS), besides activating components of the immune system, triggering inflammatory responses. The accumulation of ROS in the organism can be harmful, because it can lead to many forms of cellular modifications, besides the generation of oxidative stress. The tissues can usually defend themselves against the damages caused by ROS through the use of specific mechanisms of ROS reduction, which may be enzymatic or non-enzymatic. Among the enzymes that participate of the antioxidant defense we can highlight catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST). Of the different animal systems, the visual, is constantly exposed to UV radiation. The acute effects of UV radiation exposure on the more exposed tissues has been investigated. However, the effects of chronic exposure to UV radiation has been less investigated, mainly in the visual system. In this sense, we investigated the effects of chronic UVB exposure on the visual system of the crab *Neohelice granulata* through biochemical and morphological analyses in the region of the retina and optic lobe. The animals were exposed to a low dose (0.09 J / cm^2) of UVB radiation for 1, 15, 30 or 60 days, while the control group was exposed to visible light for the same period. In the retina, we observed an increase in the ROS concentration, in the CAT activity and GST activity after the first day of exposure to UVB radiation. After 15 days of exposure, we verified an increase on the ACAP levels, a decrease of GST activity and a decrease of LPO levels. However, after 30 days of exposure, we observed an increase of ROS concentration, a decrease of ACAP levels and a decrease of CAT activity. After 60 days of exposure, we observed an increase of the ACAP levels. In the optic lobe, we observed, after the first day of exposure, an increase on the GST activity and a decrease of LPO levels. With 15 days of exposure, we verified a decrease of ROS concentration and a decrease of CAT activity. After 30 days of exposure, we observed a decrease of CAT activity after the UVB radiation exposure. However, after 60 days, we verified an increase of ROS concentration in the exposed animals when compared to the control group. In the morphological analyses, we observed alterations after 60 days of exposure, where in the retina, we observed an inflammatory process, due to the infiltration of hemocytes in this region. In the optic lobe, we observed, after 60 days of exposure, disorganization in neuron cell bodies of external medulla. Therefore, we can conclude that the chronic exposure to a low doses of UVB radiation alters the *oxidative status* of the visual system of the crab *N. granulata*, however the defense system appears to be acting to protect the tissues from LPO triggered by ROS. In addition, even without identifying LPO damage, we can verify an inflammatory process in the visual system of *N. granulata*, which shows that there is a harmful process triggered by chronic exposure to UV radiation.

Keywords: UVB radiation; Crustacean; Reactive oxygen species; antioxidant defense system.

1. Introdução geral:

1.1 Radiação Ultravioleta

As ondas eletromagnéticas, emitidas através do sol, são uma importante fonte de energia, cujas características podem variar de acordo com o comprimento de onda (Corrêa, 2015). Segundo Diffey (2002), o que caracteriza as propriedades de qualquer região do espectro solar é o seu comprimento de onda. Neste sentido, podemos subdividir o espectro solar em: raios gama, raios X, radiação ultravioleta (UV), luz visível, infravermelho, micro-ondas e ondas de rádio.

As regiões do espectro eletromagnético, provenientes da radiação solar, que englobam a radiação UV, luz visível e o infravermelho, chegam à superfície terrestre (Balogh et al., 2011). Destas, a radiação UV que representa uma pequena parcela da radiação solar total incidente sobre a superfície terrestre, compreende uma pequena faixa deste espectro, cujos comprimentos de onda variam de 100 até 400 nm (Corrêa, 2015; Diffey, 2002).

No ano de 1932, no Segundo Congresso Internacional sobre Luz, iniciaram-se as primeiras discussões para se dividir a radiação UV em diferentes regiões do espectro de acordo com o seu comprimento de onda. Sendo assim, considerando os seus possíveis efeitos biológicos, como a capacidade de causar dano nos mais diversos componentes celulares, a radiação UV foi subdividida em três diferentes regiões: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm). Entre estas, as regiões que compreendem as faixas do UVA e do UVB são também denominadas de UV solar (Diffey, 2002), pois podem chegar até a superfície terrestre (Fabo et al., 2004), enquanto a UVC é completamente absorvida na atmosfera.

A radiação UV que chega à superfície terrestre é atenuada ao interagir com os diferentes componentes atmosféricos. Esta atenuação está diretamente relacionada com o

tipo de radiação incidente, uma vez que é mais intensa para os comprimentos de onda mais curtos (Corrêa, 2015). Dos diferentes gases presentes na atmosfera, o ozônio (O_3), formado através da junção de um átomo livre de oxigênio (O) e uma molécula de oxigênio (O_2), é responsável por absorver a maior parte da radiação UV incidente. Neste sentido, a camada de ozônio forma um escudo protetor natural da Terra contra a radiação UV.

A ação antropogênica vem provocando a depleção do ozônio estratosférico, formando o que conhecemos como “buraco na camada de ozônio”, através da produção e liberação de compostos tóxicos para o ambiente. A liberação destes compostos, como por exemplo, os derivados dos clorofluorcarbonos (CFC’s) e a sua consequente circulação até chegar a estratosfera através de mecanismos naturais atmosféricos, relacionados com a radiação ultravioleta incidente desencadeiam a destruição da molécula de ozônio (Corrêa, 2015) (Figura 1). Tal ação vem provocando progressivamente a diminuição desta camada, acarretando no aumento da incidência da radiação UV, principalmente a radiação UVB, sobre a superfície terrestre (Maverakis et al., 2010). Além disto, isto pode ter influências importantes sobre os processos biológicos, podendo provocar sérios danos à biodiversidade (McKenzie et al., 2007).

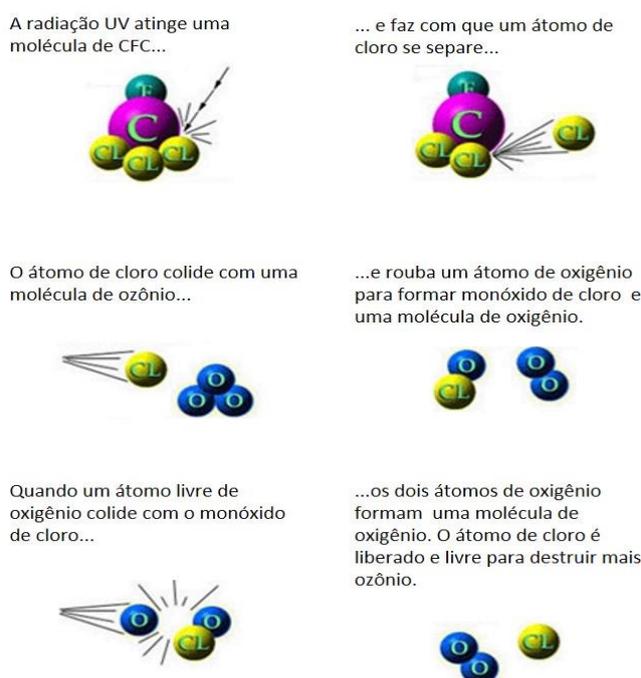


Figura 1. Representação da dissociação do ozônio mediada pela ação da radiação ultravioleta em interação com os gases CFC's. (Adaptado: <http://theozonhole.com/ozonedestruction.htm>)

1.2 Efeito da radiação ultravioleta nos organismos

Dos diferentes sistemas presentes nos organismos, o sistema visual e a pele (tegumento) são os principais a serem afetados pela exposição à radiação UV. Desta forma, podem atuar como indicadores biológicos de estudos que visam observar os possíveis efeitos desencadeados pela ação da radiação UV.

1.2.1 Efeitos da radiação UV no tegumento

A radiação UV pode ser absorvida por diferentes cromóforos presentes na pele, tais como: DNA, melanina, proteínas, aminoácidos aromáticos, lipídios, entre outros (Balogh et al., 2011). Sendo assim, a absorção da radiação UV pelos cromóforos pode acarretar em diferentes reações fotoquímicas e interações secundárias envolvendo, por exemplo, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (González et al., 2008; Gouveia et al., 2005).

A melanina é o primeiro mecanismo de defesa dos organismos, uma vez que é um pigmento absorvente dos raios UV que é capaz de dissipar a radiação ultravioleta sob a forma de calor. Este pigmento é produzido nos melanócitos e depois transferido para queratinócitos através de longas ramificações dendríticas (Maverakis et al., 2010). A radiação UV que não chega a ser absorvida por este pigmento, pode induzir danos ao DNA induzindo diretamente reações químicas dentro da molécula de DNA, tais como a formação de dímeros de pirimidinas. Uma vez que as pirimidinas sofrem modificações fotoquímicas, resultando na formação destes dímeros e demais subprodutos que são reparados, fisiologicamente, por enzimas específicas, o excesso de exposição à radiação UV torna este processo de reparo menos eficiente (Balogh et al., 2011).

Com relação aos efeitos acarretados pela exposição ao sol, um dos problemas mais discutidos é o tempo de exposição que cada indivíduo pode permanecer exposto à radiação UV. Os efeitos desencadeados pela radiação UV não se caracterizam apenas

como adversos, mas também benéficos como a síntese de vitamina D. Levando isto em consideração, existe uma controvérsia quanto ao tempo aceitável de exposição à radiação UV (Corrêa, 2015). Segundo Matsumura e Ananthaswamy (2004), que avaliaram os efeitos tóxicos da radiação UV na pele de mamíferos, a exposição repetida e excessiva à radiação UV pode provocar a deterioração gradual de estruturas celulares e consequente perda da função biológica. Além disto, o efeito cumulativo da radiação, ao atingir uma parte desprotegida do organismo, como a pele, pode acarretar em um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas (Balogh et al., 2011).

Maverakis e colaboradores (2010) apontam que a radiação ultravioleta pode ativar componentes do sistema imune cutâneo, desencadeando uma resposta inflamatória através de uma variedade de mecanismos. Estes podem ser por duas vias que se caracterizam pela ativação direta de queratinócitos e outras células que liberam mediadores inflamatórios ou pela redistribuição e liberação de autoantígenos sequestrados de células danificadas pelos raios UV.

Nos vertebrados, os efeitos adversos da radiação UV sobre o tegumento já são bem conhecidos, e incluem a imunossupressão, a qual é causada pela redução do número de células de Langerhans (Timares et al., 2008); mutação de DNA e câncer (Albert e Ostheimer, 2003).

Se por um lado, os danos desencadeados pela exposição à radiação UV na pele já têm sido bem caracterizados, por outro, pouco se tem feito no sentido de investigar os efeitos da radiação UV sobre o sistema visual, principalmente os relacionados aos efeitos desencadeados pela exposição crônica da radiação UV. Segundo Sliney (2001), estudos têm mostrado que a intensidade da radiação UV pode estar relacionada ao aparecimento dos danos celulares no sistema visual.

1.2.2 Efeitos da radiação UV no sistema visual

Os efeitos da radiação UV sobre os olhos em geral se caracterizam pela catarata (Gallagher e Lee, 2006; McCarty e Taylor 2002), fotoqueratite (Sliney, 2001), pterígio (Di Girolamo et al., 2004; Threlfall e English, 1999) e melanoma (Holly et al., 1990; Seddon et al., 1990; Tucker et al., 1985; Vajdic et al., 2001).

Destas, conforme Gallagher e Lee (2006), a catarata, que é a desordem visual relacionada à exposição à radiação UV mais disseminada ao redor do mundo, representa a opacidade do cristalino, o que tem interferência direta na passagem da luz, e por consequência prejudicando a visão. Além desta, um dos efeitos mais conhecidos desencadeados pela exposição à radiação UV é a fotoqueratite. Esta desordem caracteriza-se pela exfoliação do epitélio córneo, além da aparência de ulceração e inflamação nos olhos, causando sensação de desconforto ocular (Golu et al., 2013). Segundo Sliney (2001), a fotoqueratite parece estar limitada a comprimentos de onda menores do que 315 nm, ou seja, compreendido as regiões do UVB e UVC. O pterígio, mais comumente observado em populações de regiões associada à maior intensidade de radiação UV (Zhou et al., 2016), caracteriza-se pelo crescimento do tecido da conjuntiva sobre a córnea. No entanto, não está claro como a radiação UV induz a formação do pterígio, mas as teorias apontam que o remodelamento da matriz extracelular se dá através da estimulação da ação das citocinas e dos mecanismos imunológicos (Di Girolamo et al., 2004). Além destas, outra desordem ocular relacionada à exposição a radiação UV é o melanoma. O melanoma ocular é o tumor intraocular maligno mais comum, e com alta incidência de metástase (Ajani et al., 1992). O efeito da radiação UVB é apontado como um fator de risco para o surgimento desta, sendo que a exposição à radiação UV artificial está mais associada ao desenvolvimento do melanoma ocular (Jason et al., 2014).

Além destes estudos que abordam a ação da radiação UV no aparecimento de várias doenças oculares, já foram investigados danos celulares e morfológicos provocados pela radiação UV. Miguel e colaboradores (2003) verificaram que a retina de ratos expostos à radiação UV (UVB e UVC) apresentou mudanças significativas no núcleo e em organelas citoplasmáticas. Um outro dano bem característico da exposição do sistema visual à radiação UV é a morte celular (Hollmann et al., 2016; Miguel et al., 2007).

Se nos vertebrados, os estudos que relacionam a radiação UV com os danos visuais já têm sido bem investigados, nos crustáceos, este assunto tem sido abordado em poucos trabalhos. Miguel e colaboradores (2002) mostraram com o auxílio de microscopia eletrônica que células da retina e da *lamina gangliaris*, de caranguejos da espécie *Ucides cordatus*, apresentaram danos nucleares (cariólise e aumento da condensação da cromatina) e nas organelas (distensão do retículo endoplasmático rugoso e ruptura mitocondrial) em função da exposição às radiações UVB e UVC. Vargas e colaboradores (2010), trabalhando com uma exposição aguda das radiações UVA e UVB sobre o caranguejo *Neohelice granulata*, observaram alterações no *status oxidativo* no sistema visual destes animais. Além disto, Hollmann e colaboradores (2015), expondo em intervalos de um, três e cinco dias o caranguejo da espécie *Ucides cordatus*, à radiação UVA, UVB e a um simulador solar, observaram alterações na atividade antioxidante durante os primeiros dias de exposição.

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A ação danosa da radiação UV no sistema visual pode ocorrer por duas vias: uma direta, na qual a energia da radiação UV pode provocar alterações bioquímicas e estruturais nas células; e uma indireta, na qual a ação se dá através de moléculas que desencadeiam o processo maléfico. As principais moléculas formadas pela ação da

radiação UV no meio celular são as espécies reativas de oxigênio (Shoham et al., 2008). Estas, são produtos intermediários da redução univalente do oxigênio (Storey, 1996), sendo as principais o $O_2^{\cdot-}$ (radical ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e o $\cdot OH$ (radical hidroxila).

As EROs são tradicionalmente consideradas como subprodutos do metabolismo aeróbio, sendo a respiração mitocondrial a principal fonte intracelular de sua produção. Neste sentido, a geração de EROs depende diretamente do consumo de oxigênio e da quantidade de mitocôndrias presentes nos tecidos (Storey, 1996).

Durante o processo de respiração mitocondrial, a fosforilação oxidativa cria um fluxo de elétrons através do complexo enzimático respiratório. Este fluxo estabelece um gradiente de prótons no espaço intermembranoso, que é usado como fonte de energia para a síntese de ATP. No passo final da cadeia transportadora de elétrons, a citocromo c oxidase (complexo IV) garante a redução completa de O_2 em água sem a formação de radicais livres (Giorgio et al., 2007). No entanto, a redução parcial deste O_2 atmosférico leva a formação das espécies reativas de oxigênio, ou também chamadas de espécies ativas de oxigênio (Carvalho, 2008). Estima-se que aproximadamente 0,1 a 0,5% do oxigênio consumido pela mitocôndria seja parcialmente reduzido a $O_2^{\cdot-}$, e conseqüentemente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bayne et al., 2005).

Embora as EROs possam ser benéficas para os organismos, como por exemplo, nas células fagocíticas que geram estas moléculas para atacar microorganismos invasores, a eliminação destas precisa ser rápida para combater a sua natureza destrutiva (Storey, 1996). O acúmulo de EROs pode levar a várias formas de alterações celulares reversíveis e irreversíveis para os organismos, tendo como alvo proteínas, lipídios e DNA, que podem desencadear à perda de funções biológicas (Giorgio et al., 2007), e conseqüentemente a geração do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é um processo no qual se caracteriza pela produção excessiva de EROs em relação à capacidade antioxidante total do organismo, sendo assim definido como um desequilíbrio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros (Sies, 1991). Já Jones (2006), considerando o papel sinalizador das EROs, acrescenta que o estresse oxidativo pode ser causado por qualquer alteração no controle da sinalização redox do organismo.

1.3.1 Sistema de defesa antioxidante

As células podem normalmente se defender contra os danos desencadeados pelas EROs através do uso de mecanismos específicos de redução destas, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (Giorgio et al., 2007). As enzimas que participam da defesa antioxidante atuam como um sistema combinado e incluem a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Numa segunda linha de defesa estão as enzimas relacionadas com o metabolismo da glutathiona (GSH), A glutathiona S-transferase (GST), a glutathiona redutase (GR), glutathiona cisteína ligase (GCL) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Fig. 2) (Storey, 1996). As defesas não enzimáticas mais conhecidas incluem GSH, alfa-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), beta caroteno, ácido úrico e a melatonina (Hardeland, 2008).

Das enzimas presentes no organismo, a SOD faz parte da primeira linha de defesa, sendo responsável pela dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ye et al., 2015). O H_2O_2 é um pró-oxidante tóxico que pode participar de uma série de reações que geram mais radicais livres prejudiciais. Neste sentido, as enzimas CAT e GPx atuam na decomposição do H_2O_2 , servindo para proteger as células de subprodutos metabólicos nocivos (Liao et al., 2013).

A CAT é encontrada nos peroxissomos, sendo muito eficiente na degradação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Eboh, 2014). A enzima GPx, também responsável por catalisar a

decomposição do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos, utiliza duas moléculas de GSH como substrato, para a formação de H_2O e glutationa oxidada (GSSG) (Hermes-Lima, 2004). A enzima GR, que é dependente de NADPH, atua restabelecendo os níveis de GSH, a partir da GSSG. Além disto, há outras enzimas antioxidantes também associadas ao metabolismo da glutaciona, como por exemplo a GST. A GST catalisa a conjugação da GSH com xenobióticos ou componentes celulares danificados pelo ataque das espécies reativas, atuando na desintoxicação da célula (Storey, 1996).

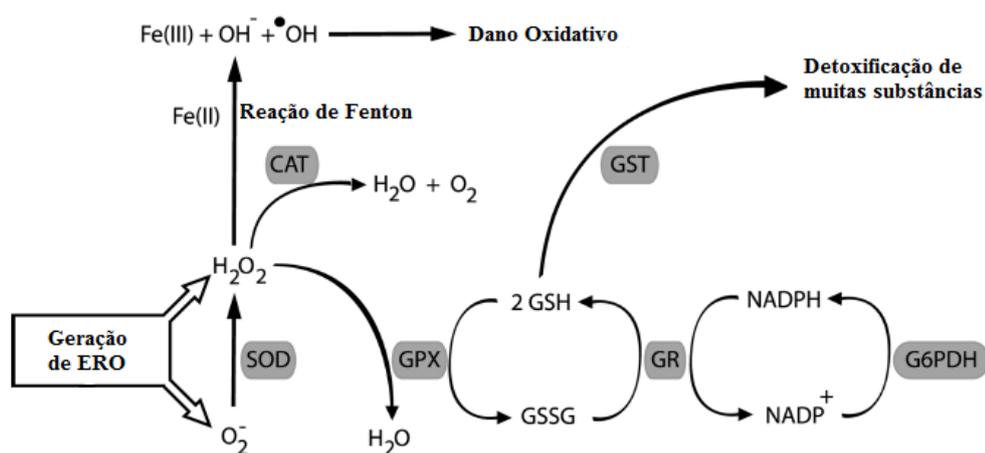


Figura 2. Representação da atuação das enzimas do sistema de defesa antioxidante atuando contra a geração de ERO. (Adaptado de Hermes-Lima (2004)).

1.4 Crustáceos

Entre os diferentes representantes deste grupo, podemos destacar os siris, caranguejos, camarões, cracas, entre outros, que juntos, perfazem atualmente mais de 40 mil espécies de crustáceos reconhecidas (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006). De maneira geral, os crustáceos podem ser divididos em cinco grandes grupos, sendo o grupo Malacostraca o maior entre eles. Os Malacostraca, na sua maioria, são representados por

crustáceos grandes de hábito bentônico, com apêndices para predação, herbivoria, bem como para se locomover e enterrar (Ruppert et al., 2005).

A ordem Decapoda é de maioria marinha e bentônica, embora também possam ser encontradas espécies de água doce (Ruppert et al., 2005). Entre todas as espécies reconhecidas de crustáceos, estima-se que cerca de 10 mil pertençam a este grupo, das quais possuem uma grande importância ecológica e econômica, pois muitas são comestíveis além de serem elos tróficos importante entre produtores e consumidores (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006; Ruppert et al., 2005).

Os caranguejos, pertencentes à ordem Decapoda, apresentam uma grande variedade de formas (Hickman et al., 2004). Dentre as diferentes espécies de braquiúros, o caranguejo da espécie *Neohelice granulata* tem um importante papel ecológico nas regiões de marismas controlando diferentes aspectos físico-químicos e biológicos destes ecossistemas (Bianchini et al., 2008).

1.4.1 *Neohelice granulata*

A família Varunidae pertence à superfamília Grapsidea, e possui ampla distribuição geográfica, estando dividida em 38 gêneros e 160 espécies (Davie et al., 2015). Dentre estas, o caranguejo *N. granulata* é encontrado na zona intertidal das regiões estuarinas do Oceano Atlântico Sul-Occidental (Pinheiro et al., 2016).

O caranguejo semiterrestre *N. granulata* é considerado uma espécie-chave, uma vez que possui grande importância em áreas intertidais de estuários tropicais e subtropicais, pois podem aumentar os níveis de oxigenação e drenagem do solo (Spivak, 2010). Além disto, constitui os macroinvertebrados mais abundantes e ecologicamente relevantes que habitam tais regiões (Angeletti e Cervellini, 2015), sendo considerados um modelo emergente para pesquisas bioquímicas, fisiológicas e ecológicas (Spivak, 2010).

N. granulata foi formalmente chamado *Chasmagnathus granulatus* por Dana (1851) (Spivak, 2010), sendo, posteriormente, transferido para o gênero *Neohelice* por Sakai e colaboradores (2006). Este, encontra-se distribuído desde o Golfo de São José, norte da Patagônia, até o estado do Rio de Janeiro, Brasil (Spivak, 2010). Esta espécie apresenta um complexo ciclo de vida, possuindo quatro estágios de zoea, um de megalopa e juvenis planctônicos. Já quando adulto, este distribui na área estuarina, onde constrói tocas verticais profundas. Estas galerias semipermanentes apresentam dimensões variáveis que acompanham os níveis da maré e do lençol freático (Pinheiro et al., 2016).

1.5 Estrutura dos olhos dos crustáceos decápoda

Alguns grupos de animais, como crustáceos e insetos, apresentam olhos compostos, que são estruturas convexas localizadas na região anterior do corpo (Land e Nilsson, 2012). Estes estão presentes em praticamente todas as classes de crustáceos, com exceção dos Copepoda (Gaten, 1998).

Nos crustáceos Decapoda, o olho é multicameral, formado por unidades que se repetem, denominadas de omatídeos (Fig. 3) (Davie et al., 2015; Grassé, 1976; Melzer et al., 1997; Schoenemann, 2013). Cada um destes é coberto por uma córnea translúcida que funciona como uma lente. Abaixo desta, há o cone cristalino, que atua como uma segunda lente, guiando o feixe de luz através de uma longa haste até alcançar a retínula. Nesta, há a presença de células retinulares, geralmente em número de oito, dispostas de maneira circular (Hill et al., 2012; Schoenemann, 2013), e centralmente a estas encontra-se o rabdômero (Allodi et al., 1995; Grassé, 1976). Esta estrutura funciona como um eixo central que possibilita que a luz chegue até os pigmentos visuais, que alteram sua conformação, e, assim, gera um sinal elétrico que pode ser processado pelo sistema nervoso do animal (Schoenemann, 2013).

Os fotorreceptores estão conectados pela zona fasciculada, formada pelos axônios das células retinulares (Allodi et al., 1995), a um grupo de três gânglios ópticos sucessivos: a *lamina ganglionaris*, a medula externa e a medula interna. Estes são os responsáveis por processar a informação captada pelos fotorreceptores da retina (Sandeman et al., 1992).

Sendo assim, torna-se necessário estudar ainda mais os efeitos da radiação UV sobre o sistema visual dos crustáceos, desde que já foi verificado que a radiação UV desencadeia danos celulares (Hollmann et al., 2015; Hollmann et al., 2016; Miguel et al., 2007; Vargas et al., 2010; Vargas et al., 2011). Além disto, os caranguejos podem estar expostos durante toda a sua vida à radiação UV, uma vez que eles habitam a superfície ou águas rasas onde o grau de penetração da radiação UV é alto, e isto poderia acarretar diversos efeitos no seu sistema visual.

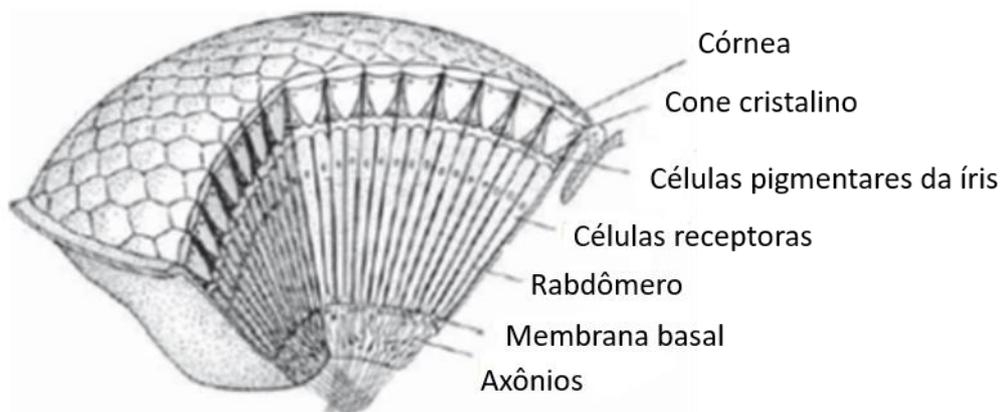


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de um olho composto, mostrando os constituintes de um omatídeo (Adaptado de Land e Nilsson, 2012).

Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos da exposição crônica à radiação UVB no *status* oxidativo e morfológico do sistema visual do caranguejo *N. granulata*.

Objetivos específicos:

- Verificar a concentração de EROs, na região da retina e gânglios ópticos, após a exposição crônica à radiação UVB;
- Avaliar a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil, na região da retina e gânglios ópticos, após a exposição crônica à radiação UVB;
- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes (catalase e glutathione S-transferase), na região da retina e gânglios ópticos, após a exposição crônica à radiação UVB;
- Avaliar os níveis de LPO, na região da retina e gânglios ópticos, após exposição crônica à radiação UVB;
- Avaliar as alterações morfológicas, na região da retina e gânglios ópticos, desencadeada pela exposição crônica à radiação UVB.

Os resultados desta dissertação serão apresentados sob a forma de manuscrito científico intitulado:

“Effects of chronic exposure of ultraviolet radiation on the visual system of crab *Neohelice granulata*”, a ser submetido ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology* (Fator de Impacto 2,416).

Effects of chronic exposure of ultraviolet radiation on the visual system of crab
Neohelice granulata

Valmor Vinicius Araujo Vaz^{1,2}, Leandra da Silva Jardim¹, Márcio Alberto Geihs³, Fabio Everton Maciel^{1,2}, Luiz Eduardo Maia Nery^{1,2}, Marcelo Alves Vargas^{1,2*}.

¹Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
Rio Grande, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - FURG.

³Instituto de Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio
Grande, RS, Brasil.

* Corresponding author: Marcelo Alves Vargas

Phone/Fax: +55 53 32935185

E-mail: biovargas@gmail.com

Universidade Federal do Rio Grande

Av. Itália km 8 Bairro Carreiros

Rio Grande – RS

Brazil

Zip Code: 96203-900

Abstract

The visual system is an important biological indicator of the studies of effects induced to UV radiation. Thus, we investigated the effects induced to chronic exposure to environmental UVB doses ($0,09\text{J}/\text{cm}^2$) in the retina and optic lobe of the crab *Neohelice granulata*. We evaluated ROS concentration, the ACAP levels, the CAT activity, the GST activity, LPO levels and histological analysis. The crabs were exposed to UVB radiation for 1, 15, 30 or 60 days, while the control group was exposed to visible light. In the retina region, we observed an increase of ROS concentration, CAT activity and GST activity after the first day of exposure. Since after 60 days, we observed an increase of ACAP levels. In the optic lobe, we observed an increase of GST activity and a decrease of LPO levels after the first day of exposure. However, we observed an increase of ROS concentration after 60 days of exposure. Moreover, we observed morphological changes only after 60 days of exposure. In the retina region, we observed an inflammatory process evidenced by infiltrating hemocytes. Since in the optic lobe, we observed a disorganization in the neuron cell bodies of the external medulla. Thus, even though we did not observe LPO damage, we observed an inflammatory process in the visual system of *Neohelice granulata*, which showed a damage process induced by chronic UVB radiation exposure.

Keywords: UVB radiation; Crustacean; Reactive oxygen species; Antioxidant defense system.

1. Introduction

The characteristics of any region from the electromagnetic spectrum vary according to their wavelength (Diffey, 2002). Therefore, considering the possible biological effects, such as the capacity of causing damage on the varied cellular components, the ultraviolet (UV) radiation was subdivided into three different regions: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm).

The UV radiation that reaches the Earth's surface is attenuated when interacting with the different atmospheric components. Among these, the ozone (O₃) is the responsible of absorbing most of the UV radiation incident. Besides, this attenuation is directly related to the kind of radiation, as it is more intense for shorter wavelength (Corrêa, 2015). Therefore, the range comprised of the UVB and UVC radiation is heavily absorbed, whereas, the UVA radiation which is not virtually absorbed, represents about 95% of the UV radiation that reaches the earth's surface (Maverakis et al., 2010).

Anthropogenic action has progressively caused depletion on the stratospheric ozone, resulting in what is known as a "hole in the ozone layer", through the production and toxic compounds released into the environment (Corrêa, 2015). Due to the depletion, there is, consequently, a marked increase in the incidence of UV radiation on the Earth's surface, especially UVB radiation (Maverakis et al., 2010). Hence, this may have important influences on the biological processes, being able to provoke serious damage to the biodiversity (McKenzie et al., 2007).

The UV radiation has as main target the animal's body surface and eyes. This radiation may be absorbed by different chromophores in the skin, such as: DNA, melanin, proteins, lipids, among others (Balgh at al., 2011). So that, the absorption of UV radiation might lead to different photochemical reactions as well as, secondary interactions which

involves, for example, the reactive oxygen species (ROS) generation (González et al., 2008).

The visual system is exposed to the sunlight, including the ultraviolet range that generates ROS and causes oxidative stress in the biological systems (Shoham et al., 2008; Wenk et al., 2001). The dermal vasculature brings a constant supply of antioxidants (Shoham et al., 2008). These are intermediate products for univalent oxygen reduction (Storey, 1996), being the main one O_2^- (Superoxide anion radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide) and the $\cdot OH$ (hidroxil radical).

The cells can normally defend themselves against the damage triggered by ROS with the use of specific mechanisms reduction, which may be enzymatic or non-enzymatic (Giorgio et al., 2007). The enzymes that participate in the antioxidant defense act as a combined system that include the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In a second line of defense are the enzymes related to the metabolism of glutathione (GSH). The S-transferase glutathione (GST), glutathione reductase (GR), glutathione cysteine ligase (GCL) and glutathione peroxidase (GPx) (Storey, 1996). The non-enzymatic defenses include: GSH, alpha-tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), beta carotene, uric acid, and melatonin (Hardeland, 2008).

Whereas in vertebrates, the UV radiation could have an adverse effects on skin which are already well known, such as, immunosuppression (Timares et al., 2008), DNA mutation and cancer (Albert and Ostheimer, 2003), the effects of UV radiation on the visual system, mainly those related to a chronic exposure to the UV radiation. These effects have not been well addressed. The effects of UV radiation on the eyes of mammals are usually characterized by cataract (Gallagher and Lee, 2006; McCarty and Taylor 2002), photoqueratite (Sloney, 2001), pterygium (Di Girolamo et al., 2004; Threlfall and

English, 1999) e melanoma (Holly et al., 1990; Seddon et al., 1990; Tucker et al., 1985; Vajdic et al., 2001).

If in vertebrates, the characterization of damage that may be caused by UV radiation has been investigated, in crustaceans, the subject has been addressed in few papers. Miguel et al. (2002) demonstrated with the help of electronic microscopy that cells from the retina and *lamina ganglionares* of the crab *Ucides cordatus* showed damage in some organelles (distension of the rough endoplasmic reticulum and mitochondrial rupture) after the exposure to UVB and UVC radiation. Vargas et al. (2010), studying an acute exposure to UVA and UVB radiation on the crab *Neohelice granulata*, observed alterations in the *oxidation status* in the visual system of these animals. Moreover, Hollmann et al. (2015) exposed the crab *Ucides cordatus* to UVA, UVB radiation and a solar simulator (SIM), in intervals of one, three or five days, and observed alterations in the antioxidant activity during the first days of exposure.

Currently, the acute effects of UV radiation in different organisms are known. However, few studies comments about the chronic effects of UV radiation in the visual system. Moreover, these studies have investigated the effects of elevated doses of UV radiation. Thus, the aim of this present study was to evaluate the concentration of ROS, the antioxidant capacity against peroxy radical (ACAP) and the activity of antioxidant enzymes. Furthermore, we assessed the morphological changes in the region of the retina and ganglia, after the chronic exposure to environmental doses of UVB radiation.

2. Materials and Methods

2.1 Animals collection and laboratory maintenance

Adult male crabs *Neohelice granulata* ($10,79 \pm 1,79\text{g}$) were collected in a saltmarsh region located in the city of Rio Grande/RS, Brazil ($32^{\circ}09'25.19''$ S/ $52^{\circ}06'09.56''$ W), and transported into the laboratory at the Federal University of Rio Grande - FURG. There, the animals were maintained for 10 days in tanks with biological filter and constant water circulation, at a photoperiod of 12L:12D, under fluorescent lamps (Philips TLT 40 W/75, São Paulo, Brazil), irradiating $96,0 \text{ mW/cm}^2$ of visible light, at a temperature of 20°C and salinity 20. The animals were fed every two days with ground beef *ad libitum*. The procedures for collecting and transporting the animals were authorized by the Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation (ICMBio), under process number: 54302-1.

2.2 Experimental design

After the period of maintenance, the animals were exposed to UVB radiation (0.09 J/cm^2) for 30 minutes daily during 1, 15, 30 or 60 days. The group control was exposed to visible light at the same time as the treated animals ($n=5$; each n pool 3 animals).

2.3 Tissue preparation

After the experimental period, the eyestalks were removed and dissected, being split into two regions: the retina and optic lobe.

For the ROS, ACAP and GST activity analysis, the tissues were homogenized in $200 \mu\text{l}$ of buffer solution containing sucrose (250 mM), EDTA (5mM) and Tris-base (10 mM), with pH adjusted to 7,6. For the catalase activity, the tissues were homogenized in $200 \mu\text{l}$ of buffer solution containing Tris-base (20 mM), EDTA (1mM, Sigma), sucrose (125mM), KCl (150 mM) and PMSF (0,1 mM), with pH adjusted to 7,6. After, the samples centrifuged ($10,000\text{g}$, 4°C for 45 min.), the supernatants were removed and led

into a new centrifugation (10.000g, 4 °C for 20 min.). The supernatants of this last centrifugation were removed and used for the respective analysis. In order to measure the levels of lipid peroxidation (LPO), the tissues were homogenized in 200 µL of methanol 100% solution (cold) and afterwards, the samples centrifuge (1.000g, 4 °C for 10 min.) and the supernatants were removed and analysed.

2.4 Biochemical analyses

2.4.1 ROS production

The detection of ROS was made according to Viarengo et al. (1999). So that, it has been used 2',7' dichlorofluorescein-diacetate (H₂DCF-DA, Molecular Probes, USA). This molecule, when oxidized by ROS, is hydrolyzed by esterases resulting in a fluorochrome which is excited at 480 nm, and detected at 525 nm. The analysis was carried out in a microplate and analyzed in a fluorimeter (Victor 2 Perkin, USA) with reading every 5 min during 120 min. The total of fluorescence was calculated by integrating the fluorescence units (FU) along the time of measurement, after adjusting FU data to a second order of polynomial function. ROS concentration was relativized by the protein concentration that is present in the biological sample and expressed in the FU (mg of protein)⁻¹.

2.4.2 Antioxidant capacity against peroxy radical (ACAP)

The analysis of the total antioxidant capacity was measured according to Amado et al. (2009). The 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) (ABAP) was used as oxidative patterns and the H₂DCF-DA as ROS production deflator. The fluorescence intensity was determined during 120 min, in an ELISA plate using a fluorimeter (Victor 2 Perkin, USA). This methodology is based on thermal decomposition of ABAP that will generate peroxy radicals. These radicals oxidize the molecule of H₂DCF-DA that generates a

fluorochrome that excited at 480 nm, but, only detected at 525 nm. The total fluorescence was calculated by integrating the fluorescence units (FU) along with the time of measurement, after adjusting the FU data to a second order of polynomial function. The results were calculated, for the same sample, with a difference in the area of FU/min with and without ABAP addition, and determined according to the equation: $ACAP = (1/\text{Fluorescence areas with ABAP} - \text{area without ABAP} / \text{area without ABAP}) / [] \text{ protein}$.

2.4.3 Catalase activity (CAT)

CAT activity was determined according to a method described by Beutler (1975). The method consists of the degradation of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm. The values of the enzymatic activity were expressed in units of CAT (one unit is the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μmol H_2O_2 per min and per mg protein at 25 °C and pH 8.0). This procedure was made by using a digital spectrophotometer.

2.4.4 Glutathione S-transferase activity (GST)

The GST activity was determined according to a method described by Habig and Jakoby (1981) that consists of forming a conjugate between 1 mM GSH and 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which is measured by absorbance at 340 nm. The results were expressed in GST units where each unit is defined by the amount of enzyme that conjugates 1mmol of CDNB per minute, per mg of protein at 25°C and pH of 7.0.

2.5 Biochemical and histological damages

2.5.1 Lipid peroxidation (LPO)

The analysis of LPO was determined through the FOX method, according to Hermer-Lima et al. (1995). This method is based on Fe (II) oxidation by LPO (FOX reactive substances) in acid pH in the presence of xylenol orange (Complexing dye with Fe (III)). The absorbance (550nm) was determined using a microplate reader, being the

cumene hydroperoxide (CHP; Sigma) used as standard. The LPO is equivalent to cumene hydroperoxide (CHP) per gram of wet mass.

2.5.2 Histological analysis

A total of six animals, for each experimental group, was separated for histological analysis, being three of the control group and three of the UVB group. After each exposure period, their eyestalks were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours, and after being dehydrated by increasing the alcohol concentration, diaphanized in xylol and impregnated in Paraplast® in the automatic processor (LEICA ASP 200S). After the samples were cut (6 µm), with the help of a microtome (LEICA RM2255), the slides were stained with hematoxylin and eosin, and posteriorly observed in a Olympus BX51 microscope and the images were acquired through the DP72 camera.

2.6 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Previously, the assumptions of the analysis of variance (normality and homoscedasticity) were tested. The results of all experiments were expressed as a percentage compared to the control group.

3. Results

The control group of the retina and optic lobe, showed different values for ROS concentration, ACAP levels, CAT activity, GST activity and LPO levels for 1, 15, 30 ou 60 days (Table 1).

3.1 ROS concentration

The animals displayed a significant increase in ROS concentration in the retina when exposed to the UVB radiation compared to control (Fig. 1.A) in the first day of

exposure. However, there was no significant difference ($p > 0.05$) in the optic lobe of the exposed animals when compared to the control group (Fig. 1.A). In 15 days of exposure, the animals showed a decrease in ROS concentration in the optic lobe (Fig. 1.B), being that, the same not observed in the retina region (Fig. 1.B). After 30 days of exposure, the animals showed an increase of the ROS concentration in the retina (Fig. 1.C) after exposure to the UVB radiation. In addition, after 60 days of exposure, ROS concentration increased in the optic lobe (Fig. 1.D) when exposed to UVB radiation, different from what was observed in the retina (Fig. 1.D).

3.2 Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)

In the first day of exposure, no significant differences were found ($p > 0.05$) in any of the studied regions (Fig. 2.A). However, after 15 days of exposure, there was a significant increase of ACAP levels in the retina (Fig. 2.B) of the exposed animals when compared to the control group. Also in the optic lobe (Fig. 2.B) there was no significant difference ($p > 0.05$) from the animals exposed to UVB radiation when compared to the control group. After 30 days of exposure a decrease of ACAP levels was observed in the retina (Fig. 3.C) of the exposed animals when compared to the control group. However, this was not observed in the optic lobe (Fig. 3.C) of the exposed animals ($p > 0.05$). After 60 days of exposure there was a significant increase of ACAP levels in the retina (Fig. 3.D) of the animals exposed to UVB radiation when compared to the control group, however this was not observed in the optic lobe (Fig. 3.D) ($p > 0.05$).

3.3 Catalase activity (CAT)

The animals, in the first day of exposure, showed a significant increase of CAT in the retina (Fig. 3.A) when exposed to UVB radiation, compared with the control group. Also in the optic lobe (Fig. 3.A), there was no significant difference ($p > 0.05$). After 15 days of exposure, there was no significant difference ($p > 0.05$) in the retina (Fig. 3.B) of

the exposed animals in comparison to the control group. However, there was a decrease of CAT activity in the optic lobe (Fig. 3.B) of the exposed animals in comparison to the control group. After 30 days of exposure, there was a decrease of the CAT in both regions (Fig. 3.C) ($p > 0.05$) between the animals exposed to UVB radiation and the control groups. However, after 60 days of exposure, no significant differences were observed in any of the studied regions (Fig. 3.D) ($p > 0.05$).

3.4 Glutathione S-transferase activity (GST)

GST activity in both studied regions increased significantly in the first day of exposure to UVB radiation (Fig. 4.A) when compared to the control group. However, there was a decrease in the GST activity in the retina of exposed animals when compared to the control group (Fig. 4.B), in the after 15 days of exposure. No significant difference ($p > 0.05$) was observed in the optic lobe (Fig. 4.B) of the animals exposed to UVB radiation in comparison to the control group after 15 days of exposure. After 30 days of exposure, there were no significant differences ($p > 0.05$) in any of the regions (Fig. 4.C) between the exposed animals and their respective controls. This was also observed after 60 days of exposure (Fig. 4.D).

3.5 Lipid peroxidation (LPO)

At the first day of exposure, we observed a significant decrease of LPO levels in optic lobe (Fig. 5.A) of the animals exposed to UVB radiation when compared to their control group. However, in the retina (Fig. 5.A) there was no significant difference ($p > 0.05$) between the animals exposed to UVB radiation and the control groups. After 15 days of exposure, we observed a decrease of LPO in the retina (Fig. 5.B) of the exposed animals when compared to the control group. However, no significant difference ($p > 0.05$) was observed in the optic lobe (Fig. 5.B) of the exposed animals in comparison to their control. After 30 days of exposure, there was no significant difference ($p > 0.05$) in

any of the regions (Fig. 5.C) between the exposed animals and their respective controls. This was also observed after 60 days of exposure (Fig. 5.D).

3.6 Histological analyses

The sections of the crab's retinas exposed for 1, 15 and 30 days showed no difference from those of the control groups. However, when the crabs were exposed to UV radiation during 60 days, we observed differences in the eyestalk morphology. The retina and fasciculated zone of the crabs that have been exposed to UVB radiation for 60 days, showed an inflammatory reaction, with hemocytes infiltrated in the retina and fasciculated zone (Fig 6.B). The same was not observed in the retina and fasciculated zone of control group (Fig. 6.A). However, the *medulla externa* showed enlarged vascular sinuses and disorganized aspect in the neuronal cell bodies (Fig. 6.D). The same was not observed in this ganglion of the control group (Fig. 6.C).

4. Discussion

The acute effects of UV radiation on the most exposed tissues have been investigated. However, the chronic effects of UV radiation have been made with less intensity, especially in the visual system. Thus, we have investigated the effects caused by the chronic exposure to UVB radiation in the visual system of the crab *Neohelice granulata*, through biochemical and morphological analyses in the retina and the optic lobe after exposure to environmental doses of UVB radiation.

Acute and chronic exposures may result into different responses depending on the tissue studied. In this case, the visual system of the crab *N. granulata* is exposed to UV radiation. Therefore, in our work, we analyzed the exposure of animals from 1 day to 60 days. We have viewed alterations in the *oxidative status*, in both of the retina and the optic lobe.

The animals exposed to UV radiation presented a significant increase in ROS concentration in the retina and optic lobe. Vargas et al. (2011), observed that animals exposed to UVB radiation with elevated doses (1,2 J/cm²) showed an increase of ROS concentration when compared to the control. Kim et al. (2015) working with a copepod *Tigriopus japonicus*, verified also an increase in ROS concentration after the acute UVB radiation exposure with elevated doses (2,4 J/cm²). Thus, if we relate the results of acute (Kim et al., 2015; Vargas et al., 2011) and chronic exposure (this study), we perceive that there is an increase of ROS concentration in both, acute and chronic UVB radiation exposure in crustaceans.

We observed ACAP levels ocilation in the retina and optic lobe of animals exposure to UVB radiation. Hollmann et al. (2015), exposed crabs of the *Ucides cordatus* at intervals of one, three and five days to low doses of UVB radiation (0,0002 J/cm²) and observed ACAP in the brain and eyestalk of these animals. In the eyestalk, the ACAP levels present no significant difference comparing with the control group. Hence, on the third day of exposure, there was a decrease in ACAP level on the crabs exposed to UVB radiation in comparison to the control group. However, on the 15 day of exposure, the levels of ACAP present no significant difference in comparison to the control group. Vargas et al. (2010), working with acute exposure of UVB radiation with elevated doses (1,2 J/cm²), did not observe significant differences in ACAP after the UV radiation exposure of animals acclimated to 12L:12D. Thus, we suggest that the exposure to UV radiation can alter ACAP levels in different manners in crustaceans. The acute effect of UV radiation exposure on the crabs: *Ucides cordatus* (Hollmann et al., 2015) and *N. granulata* (Vargas et al., 2010) presents no significant difference in ACAP levels regarding the control group. This was also observed in this study in short-term exposure on the first day. However, when eyestalks of the crab *Ucides cordatus* were exposed to

UVB radiation for 3 days, they presented a decrease of ACAP levels, but when the crabs were exposed to UVB radiation for 5 days presented no significant difference in relation to control group (Hollmann et al., 2015). In the same way in this study, since we also observed an oscillation in ACAP levels during the chronic exposure to low doses of UVB radiation, showing that the ACAP levels have a modulatory behavior into combat the increase of ROS concentration, activating different enzymatic and no enzymatic molecules in this protective process.

We also observed and oscillatory effect of UVB radiation in CAT activity in the retina and optic lobe. Vega and Pizzaro (2000) working with *Daphnia longispina* verified that there was an increase on the catalase activity after an acute UVB radiation (0,11 J/cm²) exposure. Furthermore, it has been observed, an increase on the CAT activity after the crab *N. granulata* (Vargas et al., 2010) exposure to elevated doses of UVB radiation (1,2 J/cm²). These results confirm our findings because, after the exposure to UVB radiation, the CAT activity increased on the first day of exposure. Thus, since there was an increase of the ROS concentration, there would be a need to activate the antioxidant defense. However, the decrease in CAT activity after 15 and 30 days could be related to the indirect effects of UV radiation in the visual system according to Zigman et al. (1996), who reported that both singlet oxygen and hydroxyl radical formation involved in UV radiation exposure could induce an inhibition of CAT activity in rabbit and squirrel's lens epithelial cells.

In GST activity we observed an increase in both visual regions studied when exposure to acute UVB radiation. However, in chronic UVB radiation exposure we observed a decreased in GST activity. Hollmann et al. (2015) observed an increase in GST activity in the eyestalk of *Ucides cordatus* after one day of exposure, although, this activity has decreased on the third and 15 day of the exposure. Kim et al. (2015) observed

an increase in GST activity in the copepod *Tigriopus japonicus* after the exposure to UVB radiation. Also working with *Tigriopus japonicus*, Rhee et al. (2012) observed an increase in GST activity after 48h of exposure to UVB radiation (1,2 J/cm²). These results confirm our study, because 1 day of exposure to UVB radiation induced an increase in GST activity in crustaceans. However, long exposures of 15, 30 and 60 days may cause deactivation of GST, which is more pronounced at the 15 days causing, even, a decrease in GST activity.

To verify the damages induced by UV radiation in the visual system of the crab *N. granulata*, we analyzed LPO levels. The LPO levels present a decreased in both visual regions studied after exposure to UVB radiation. In the first day of the exposure to UV radiation, we observed a decrease in LPO levels in optic lobe. By the way, after 15 days of exposure, we observed a decrease in LPO levels in the retina. Different from work, Hollmann et al. (2015) observed, in the eyestalk, an increase of LPO levels in animals after 1 day of exposure to UVB radiation. On the other hand, in the 15 day of exposure, the LPO levels decreased in relation to control group. According to the authors, the time of exposure might not be enough for activate the mechanism of defense to reverse the LPO levels. The fact that we could not find any oxidative damage in long exposures, may be related with mechanisms of defense, as a way to combat the damages induced from the chronic exposure to UV radiation.

On the first day of the exposure, the retina presented an increase in ROS concentration, as well as an increase in the CAT activity and GST as well, which are antioxidant enzymes responsible of the tissue protection. However, the ACAP and LPO levels present no significant differences between the animals exposed to UVB radiation and the control group. Even though, the increase of ROS concentration in the retina and the ACAP levels present no significant difference of control group, this do not induce

LPO damage, because the CAT and GST activities were increased. The same as, a chronic exposure during 60 days in retina region of animals exposure, does not show any significant difference in ROS concentration, in the CAT activity, GST activity and LPO levels as well, in relation to the control groups. However, we can see the ACAP levels increasing in this region, indeed. Therefore, the increase of ACAP observed in this region after 60 days of exposure to UVB radiation, may protect the tissue from LPO damage. Thus, it seems that the antioxidant of the visual system of crab *N. granulata* is activated in order to support chronic exposures, protecting the tissue from LPO damages.

In the ganglia, we did not observe any alterations in ROS concentration, ACAP levels and CAT activity on the first day. However, we have observed an increase in GST activity and a consequent decrease in LPO levels. Thus, the decrease in LPO levels of the ganglia cells region regarding the animals that were exposed to UVB radiation is directly related to an increase of GST activity, which is an enzyme responsible of removing the effect of LPO damage (Storey, 1996). Moreover, in the optic lobe, the animals exposed to UVB radiation for 60 days, did not demonstrate a significant difference in the ACAP levels, LPO levels, CAT activity and the GST activity. On the other hand, we have observed an increase in the ROS concentration. Thus, the fact of a higher ROS concentration does not induce a LPO damage. It may be related to the increase of other antioxidant enzymes as the GPx and SOD after 60 days of a chronic exposure to UVB radiation.

The effects induced for UV radiation exposure at structural levels in the visual system has been already shown (Busch et al., 1999; Gorgels and van Norren., 1995; Sliney, 2001; Yam and Kwok, 2013; Young, 2006; Zigman and Vaughan 1974). However, in our study, we have noticed structural alterations in the optic lobe, and an inflammatory process in the retina after 60 days of exposure. This fact leads us to

understand that long-term exposures can significantly alter the physiological functions of the crustacean's visual system. The inflammatory reaction in the visual system of mammals after their chronic exposure to UV radiation has also been perceived by Hiramoto et al. (2017) lately. According to these authors, the inflammatory reaction is provoked by the increase of ROS concentration, which is activated by the UV radiation. Therefore, in our study, even without identifying LPO damage after a chronic exposure to UV radiation, we may observe an inflammatory process in the visual system of crab *N. granulata*, which shows that there is a damage caused by the chronic exposure to UV radiation.

5. Conclusion

We conclude that the chronic exposure to the UVB radiation, in environmental doses, alter the *oxidative status* of the visual system of crab *N. granulata*, but the antioxidant system may protect the tissue from damages caused by ROS concentration. However, after 60 days of exposure, we observed an inflammatory process, wich show a visual damage.

6. Acknowledgements

This study was supported by CAPES and Institute of Biological Sciences of the Federal University of Rio Grande (Brazil). We are grateful to Diego Matheus Reinicke and Mariana Quaresma Souza for assistance.

7. References:

- Albert, M.R., Ostheimer, K.G., 2003. The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure: part 2. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48, 909–918.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115-2123.
- Balogh, T.S., Velasco, M.V.R., Pedriali, C.A., Kaneko, T.M., Baby, A.R., 2011. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *An. Bras. Dermatol.* 86, 732-742.
- Beutler, E., 1975. The preparation of red cells for assay. In: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, New York, pp. 8–18.
- Busch, E.M., Gorgels, T.G., Van Norren, D., 1999. Temporal sequence of changes in rat retina after UV-A and blue light exposure. *Vision Res.* 39, 1233-1247.
- Corrêa, M.P., 2015. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *An. Bras. Dermatol.* 90, 297-313.
- Diffey, B.L., 2002. What is light?. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18, 68-74.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Coroneo, M.T., Wakefield, D., 2004. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog. Retin. Eye Res.* 23, 195-228.
- Gallagher, R.P., Lee, T.K., 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92, 119-131.

- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P.G., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722-728.
- González, S., Fernández-Lorente, M., Gilaberte-Calzada, Y., 2008. The latest on skin photoprotection. *Clin. Dermatol.* 26, 614-626.
- Gorgels, T.G., van Norren, D., 1995. Ultraviolet and green light cause different types of damage in rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 851-863.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. *Methods Enzymol.* 77, 398–405.
- Hardeland, R., 2008. Melatonin, hormone of darkness and more—occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2001-2018.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 3, 271– 280.
- Hiramoto, K., Yamate, Y., Sato, E.F., 2017. Long-Term ultraviolet A eye irradiation causes retina denaturation in mice. *Biomed. Hub.* 2, 5-5.
- Hollmann, G., de Jesus Ferreira, G., Geihs, M.A., Vargas, M.A., Nery, L.E.M., Leitão, Á., Linden, R., Allodi, S., 2015. Antioxidant activity stimulated by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquat. Toxicol.* 160, 151-162.
- Holly, E.A., Aston, D.A., Char, D.H., Kristiansen, J.J., Ahn, D.K., 1990. Uveal melanoma in relation to ultraviolet light exposure and host factors. *Cancer Res.* 50, 5773-5777.
- Kim, B.M., Rhee, J.S., Lee, K.W., Kim, M.J., Shin, K.H., Lee, S.J., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2015. UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 167, 15-23.

- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M.P., Correa, G., Ono, Y., Goodarzi, H., 2010. Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.* 34, J247-J257.
- McCarty, C.A., Taylor, H.R., 2002. A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts. In: *Progress in Lens and Cataract Research*. Karger Publishers. pp. 21-31.
- McKenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Björn, L.O., Ilyas, M., 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 218-231.
- Miguel, N.C.D.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.
- Rhee, J.S., Kim, B.M., Choi, B.S., Lee, J.S., 2012. Expression pattern analysis of DNA repair-related and DNA damage response genes revealed by 55K oligomicroarray upon UV-B irradiation in the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 155, 359-368.
- Seddon, J.M., Gragoudas, E.S., Glynn, R.J., Egan, K.M., Albert, D.M., Blitzer, P.H., 1990. Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma: a case-control study. *Arch. Ophthalmol.* 108, 1274-1280.
- Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, J.L., Mydlarski, M.B., Schipper, H.M., 2008. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1047-1055.
- Sliney, D.H., 2001. Photoprotection of the eye – UV radiation and sunglasses. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 64, 166–175.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.

- Threlfall, T.J., English, D.R., 1999. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve. *Am. J. Ophthalmol.* 128, 280-287.
- Timares, L., Katiyar, S.K., Elmetts, C.A., 2008. DNA damage, apoptosis and Langerhans cells — activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.* 84, 422–436.
- Tucker, M.A., Shields, J.A., Hartge, P., Augsburger, J., Hoover, R.N., Fraumeni Jr, J.F., 1985. Sunlight exposure as risk factor for intraocular malignant melanoma. *N. Engl. J. Med.* 313, 789-792.
- Vajdic, C.M., Krickler, A., Giblin, M., McKenzie, J., Aitken, J., Giles, G.G., Armstrong, B.K., 2001. Eye color and cutaneous nevi predict risk of ocular melanoma in Australia. *Int. J. Cancer*, 92, 906-912.
- Vargas, M.A., Geish, M.A., Maciel, F.E., Cruz, B.P., Filgueira, D.M.V.B., de Jesus Ferreira, G., Nery, L.E.M., Allodi, S., 2010. Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151, 343-350.
- Vargas, M.A., Geihs, M.A., Maciel, F.E., Cruz, B.P., Nery, L.E.M., Allodi, S., 2011. The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulata*: a protective role of melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 154, 427-434.
- Vega, M.P., Pizarro, R.A., 2000. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 54, 121-125.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Panzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 46, 1612–1619.

- Wenk, J., Brenneisen, P., Meewes, C., Wlaschek, M., Peters, T., Blaudschun, R., Ma, W.,
Kuhr, L., Schneider, L., Scharffetter-Kochanek, K., 2001. UV-induced oxidative
stress and photoaging. *Curr. Probl. Dermatol.* 29, 83–94.
- Yam, J.C., Kwok, A.K., 2014. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int. Ophthalmol.* 34,
383-400.
- Young, A.R., 2006. Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Prog. Biophys. Mol.
Biol.* 92, 80-85.
- Zigman, S., Vaughan, T., 1974. Near-ultraviolet light effects on the lenses and retinas of
mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 462-465.
- Zigman, S., Reddan, J., Schultz, J.B., McDaniel, T., 1996. Structural and Functional
Changes in Catalase Induced by Near-UV Radiation. *Photochem. Photobiol.* 63, 818-
824.

Legends of figures

Fig. 1 – Concentration of Reactive Oxygen Species (ROS) in the visual system of the crab *Neohelice granulata* (retina and optic lobe) after exposure to UVB radiation. (A) 1 day of exposure; (B) 15 days of exposure; (C) 30 days of exposure; (D) 60 days of exposure. Data were expressed as percentages relative to the control group (100%). (*) Means significant difference ($p < 0.05$) between the exposed animals and the control group.

Fig. 2 – Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) in the visual system of the crab *Neohelice granulata* (retina and optic lobe) after exposure to UVB radiation. (A) 1 day of exposure; (B) 15 days of exposure; (C) 30 days of exposure; (D) 60 days of exposure. Data were expressed as percentages relative to the control group (100%). (*) Means significant difference ($p < 0.05$) between the exposed animals and the control group.

Fig. 3 – Catalase Activity (CAT) in the visual system of the crab *Neohelice granulata* (retina and optic lobe) after exposure to UVB radiation. (A) 1 day of exposure; (B) 15 days of exposure; (C) 30 days of exposure; (D) 60 days of exposure. Data were expressed as percentages relative to the control group (100%). (*) Means significant difference ($p < 0.05$) between the exposed animals and the control group.

Fig. 4 – Glutathione S-transferase activity (GST) in the visual system of the crab *Neohelice granulata* (retina and optic lobe) after exposure to UVB radiation. (A) 1 day of exposure; (B) 15 days of exposure; (C) 30 days of exposure; (D) 60 days of exposure.

Data were expressed as percentages relative to the control group (100%). (*) Means significant difference ($p < 0.05$) between the exposed animals and the control group.

Fig. 5 – Lipoperoxidation levels (LPO) in the visual system of the crab *Neohelice granulata* (retina and optic lobe) after exposure to UVB radiation. (A) 1 day of exposure; (B) 15 days of exposure; (C) 30 days of exposure; (D) 60 days of exposure. Data were expressed as percentages relative to the control group (100%). (*) Means significant difference ($p < 0.05$) between the exposed animals and the control group.

Fig. 6 – Longitudinal histological sections of the eyestalk of the crab *Neohelice granulata* stained with hematoxylin and eosin. (A) Retina and fasciculated zone after 60 days exposure (control group) - H&E stain; (B) Retina and fasciculated zone evidencing the inflammatory process (arrow) after 60 days exposure - H&E stain; (C) External medulla after 60 days of exposure (control group) - H&E stain; (D) External medulla with enlarged vascular sinuses (arrow head) and disorganization of the regular arrangement of the cell bodies (arrows) after 60 days of exposure - H&E stain.

Table 1 – Value for ROS concentration, ACAP levels, CAT activity, GST activity, LPO levels of control group (mean \pm SEM), of the retina region and optic lobe, for 1, 15, 30 e 60 days.

Figure 1

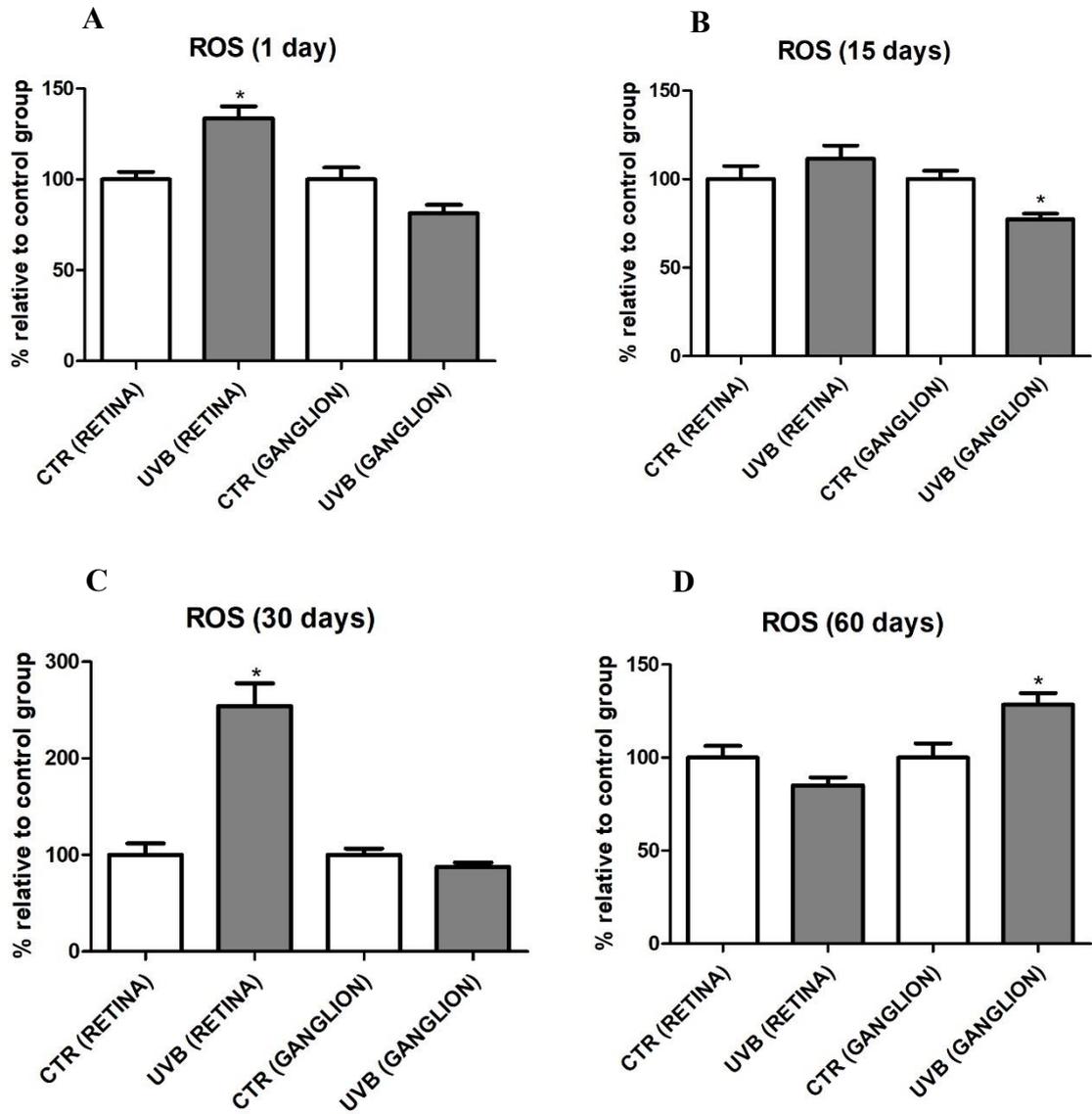


Figure 2

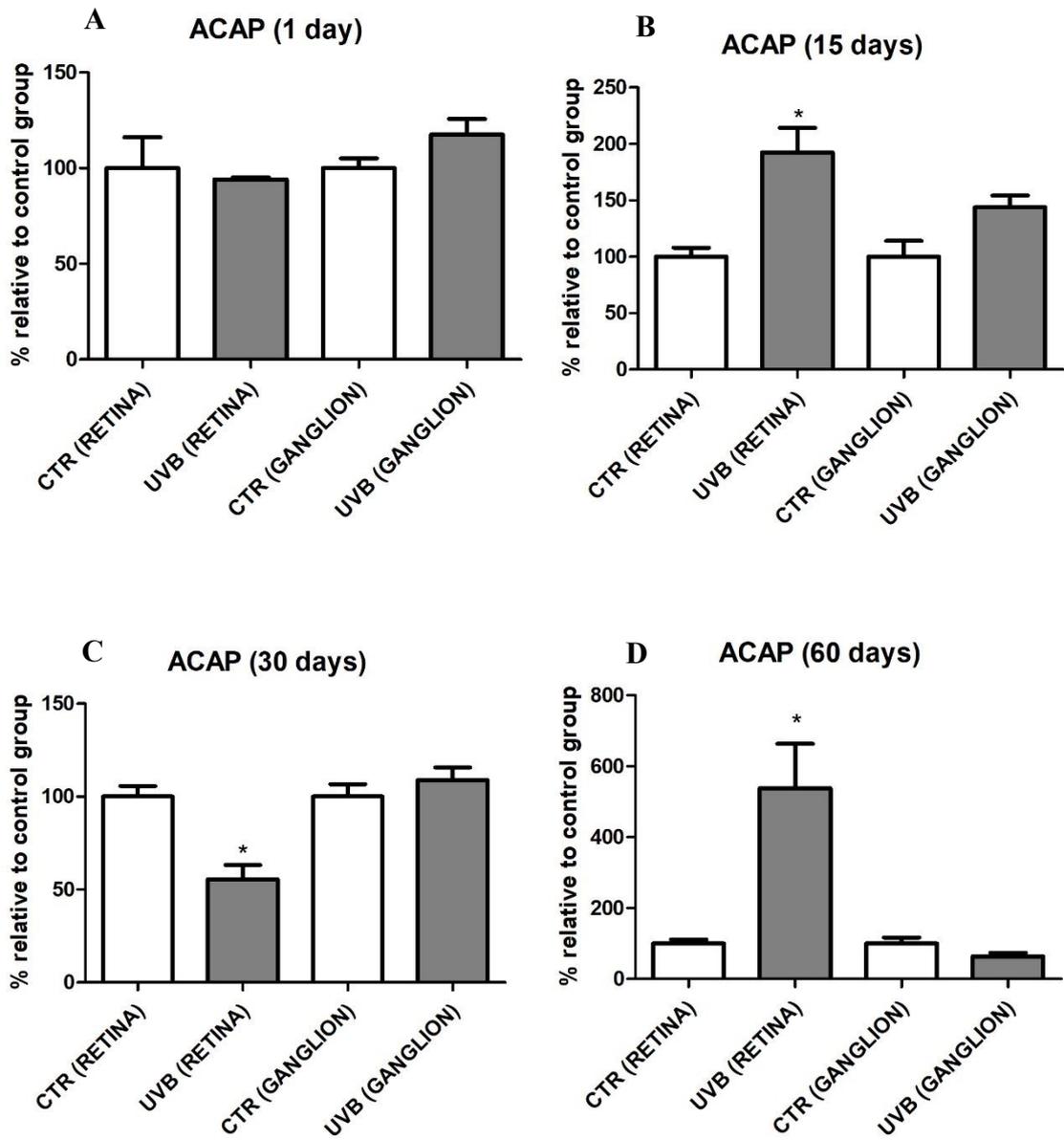


Figure 3

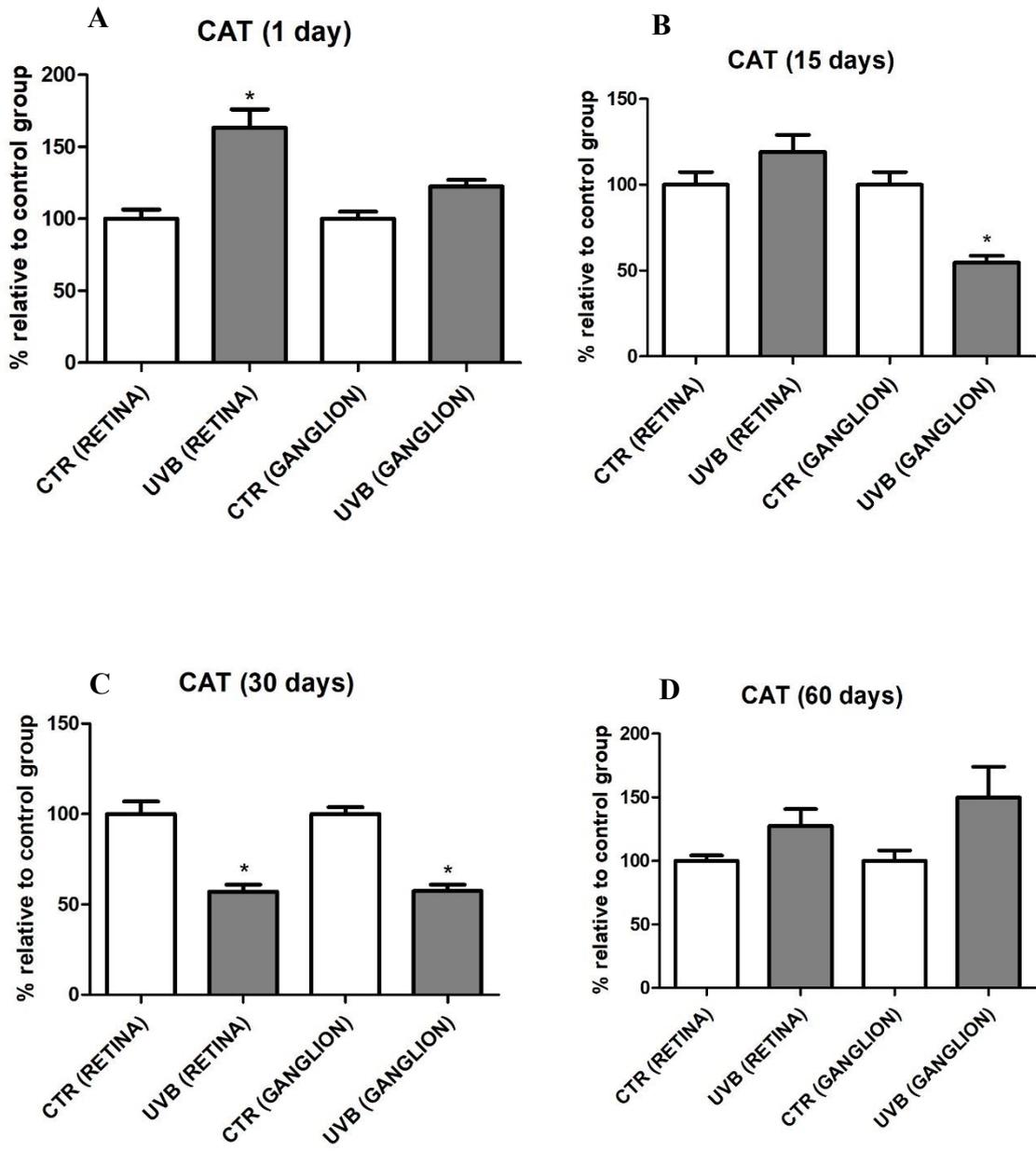


Figure 4

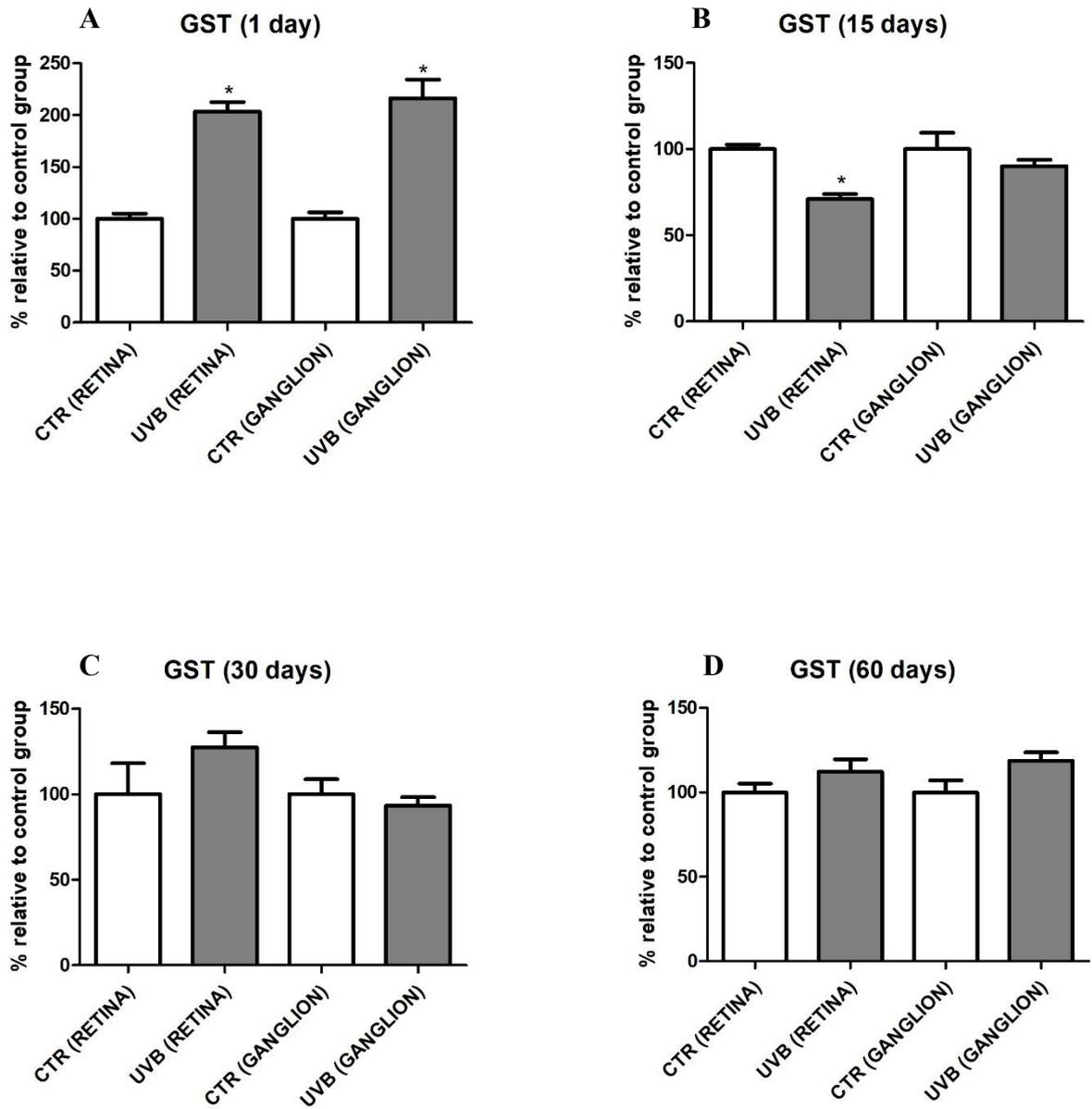


Figure 5

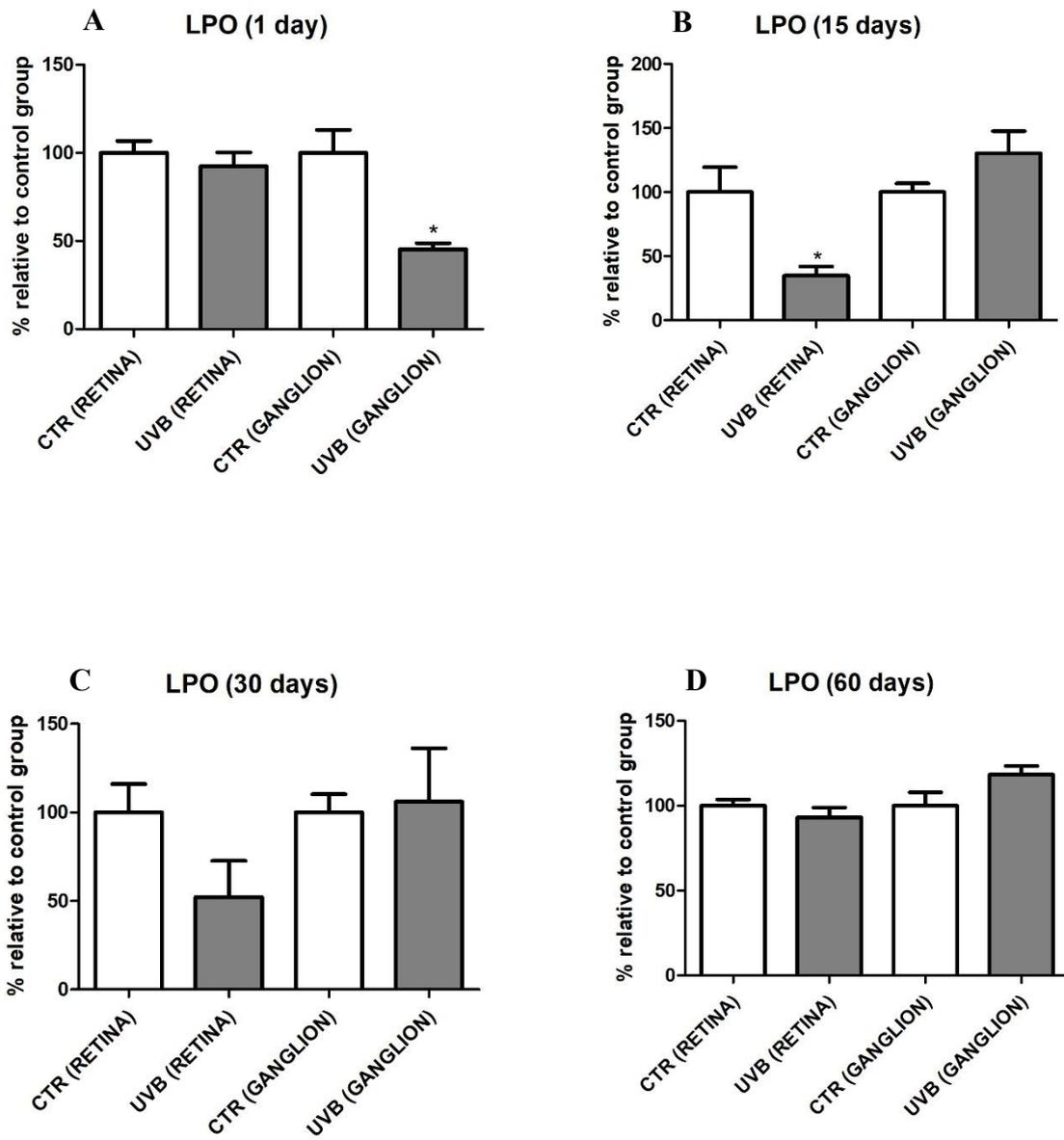


Figure 6

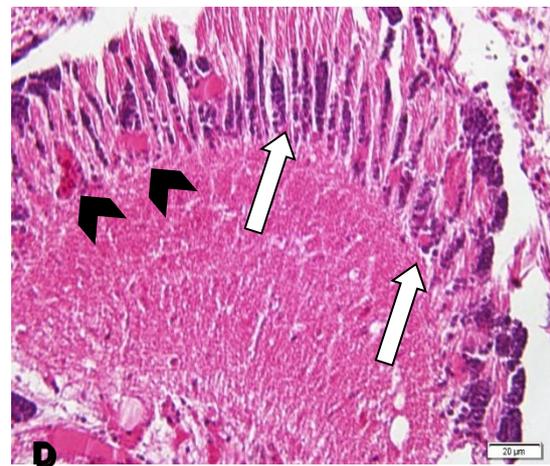
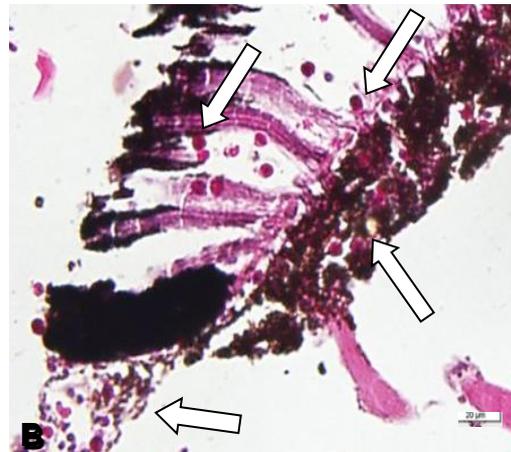


Table 1

Analyses	Experimental time												
	1 day			15 days			30 days			60 days			
	Retina	Ganglia	Retina	Ganglia	Retina	Ganglia	Retina	Ganglia	Retina	Ganglia	Retina	Ganglia	
ROS (FU (mg of protein)-1) ACAP	65477.86 ± 2706.03 0.1087 ± 0.017	187534.16 ± 23332.22 0.0538 ± 0.0032	22308.42 ± 1660.62 0.1495 ± 0.012	142331.25 ± 6842.05 0.1165 ± 0.016	664165.38 ± 78576.20 0.0353 ± 0.002	1588070.46 ± 104119.61 0.1031 ± 0.0069	197322.58 ± 12360.88 0.0464 ± 0.053	607698.62 ± 46865.45 0.1931 ± 0.0383					
LPO (CHP (g of wet mass)-1)	3.2192 ± 0.22	9.7188 ± 1.27	9.1576 ± 1.77	25.0616 ± 1.70	6.6382 ± 1.06	7.2338 ± 0.74	3.0806 ± 0.11	3.3474 ± 0.26					
CAT (UCAT (mg of protein)-1)	30.2108 ± 1.94	43.7805 ± 2.13	65.7068 ± 4.86	91.0158 ± 6.76	32.1040 ± 2.21	34.5954 ± 1.32	76.0849 ± 3.24	58.0447 ± 4.78					
GST (UGST (mg of protein)-1)	49.1185 ± 2.48	55.2644 ± 3.47	71.5546 ± 1.96	121.3983 ± 11.55	19.1264 ± 3.46	43.8535 ± 3.86	56.7437 ± 2.93	72.3018 ± 5.14					

Discussão Geral

Os efeitos agudos da exposição à radiação UV sobre os tecidos mais expostos têm sido investigados. Entretanto, os efeitos da exposição crônica à radiação UV têm sido investigado com menos intensidade, principalmente no sistema visual. Desta forma, estudamos os efeitos provocados pela exposição crônica da radiação UVB no sistema visual do caranguejo *N. granulata*, através de análises bioquímicas e morfológicas na região de retina e gânglios ópticos.

A constante preocupação com as mudanças ambientais tem levado a um maior interesse em investigar os efeitos desencadeados pela exposição à radiação UV em muitos organismos (Huebner et al., 2009). Basicamente, podemos dividir os efeitos da radiação UV de duas formas, aguda e crônica. Segundo Matsumura e Ananthaswamy (2004), a exposição aguda à radiação UV induz lesões de DNA, tais como dímeros de pirimidina, enquanto a exposição mais prolongada à radiação UV causa a deterioração gradual de estruturas celulares com a consequente perda de função biológica. Além destes efeitos, a radiação UV afeta diretamente os olhos e, a cada ano, estima-se que aproximadamente 3 milhões de pessoas sofram perda da visão devido aos danos relacionados a radiação UV (González et al., 2008). Neste sentido, a ação cumulativa da radiação UV pode provocar um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas (Balogh et al., 2011).

Quando analisamos a concentração de EROs nos animais expostos ao primeiro dia, observamos um aumento significativo na região da retina quando comparados ao grupo controle. No entanto, o mesmo não foi observado na região de gânglio. Após 30 dias, novamente foi observado um aumento na concentração de EROs na retina dos animais expostos. Já após 60 dias, observamos um aumento na região de gânglio dos animais expostos à radiação UVB, comparados ao grupo controle. Vargas e colaboradores (2011), avaliando o efeito protetor da melatonina contra a exposição à radiação UV,

observaram que animais expostos à elevadas doses (1,2 J/cm²) de radiação UVB mostraram um aumento na concentração de EROs quando comparados ao grupo controle. Kim e colaboradores (2015) trabalhando com o copépodo *Tigriopus japonicus*, também verificaram um aumento na concentração de EROs após uma exposição aguda à doses elevadas (2,4 J/cm²) de radiação UVB. Assim, avaliando exposições agudas (Kim et al., 2015; Vargas et al., 2011) e crônicas (neste estudo) à radiação UVB, podemos perceber que há um aumento na concentração de EROs em ambas, nos diferentes crustáceos.

Sabe-se que EROs têm alta capacidade de prejudicar biomoléculas, tais como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Lassen et al., 2008). Embora as EROs sejam parte dos processos regulatórios normais para o organismo e o estado redox celular seja controlado por enzimas antioxidantes, o aumento da concentração de EROs pode desencadear a perda da homeostasia redox celular (Wenk et al., 2001). O sistema de eliminação de EROs é composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Tong et al., 2015). Aliado à isto, há a própria capacidade do tecido de se proteger dos efeitos desencadeados pela ação destas moléculas nos sistemas biológicos. Neste sentido, a ACAP também elevada, evita danos celulares provocados pelo aumento de EROs.

Neste estudo, avaliamos a ACAP das diferentes regiões do sistema visual. Após 30 dias de exposição, observamos uma diminuição dos níveis da ACAP na retina dos animais expostos. No entanto, após 15 e 60 dias de exposição, houve um aumento significativo nos níveis de ACAP na região da retina dos animais expostos. Hollmann e colaboradores (2015), expondo caranguejos da espécie *Ucides cordatus* por um, três e cinco dias à baixas doses (0,0002 J/cm²) de radiação UVB observaram níveis de ACAP no cérebro e pedúnculo ocular destes animais. No primeiro dia, no pedúnculo ocular, os níveis de ACAP não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Já no terceiro dia, houve uma diminuição nos caranguejos expostos à radiação UVB em

comparação ao grupo controle. No entanto, no quinto dia de exposição, os níveis de ACAP não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Vargas e colaboradores (2010), trabalhando com exposições agudas de radiação UVB em doses elevadas ($1,2 \text{ J/cm}^2$), não observaram diferença significativa nos níveis de ACAP após a exposição a radiação UV nos animais aclimatados a 12L:12D. Assim, podemos sugerir que exposições à radiação UV alteram os níveis de ACAP de diferentes maneiras nos crustáceos. Os efeitos agudos da exposição à radiação UV no caranguejo *Ucides cordatus* (Hollmann et al., 2015) e no caranguejo *N. granulata* (Vargas et al., 2010) não apresentaram diferença significativa nos níveis de ACAP em relação aos grupos controles. Isto, também foi observado neste estudo, após à exposição no primeiro dia. No entanto, quando os pedúnculos oculares do caranguejo *Ucides cordatus* foram expostos à radiação UVB por 3 dias, houve um decréscimo dos níveis de ACAP, porém quando expostos à radiação UVB por 5 dias, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (Hollmann et al., 2015). No presente estudo, nós também observamos uma oscilação nos níveis de ACAP após exposição crônica à baixas doses de radiação UVB.

A enzima CAT é uma das responsáveis por minimizar os danos celulares nos tecidos submetidos à estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004; Storey, 1996). Sendo assim, avaliamos a atividade desta após exposição crônica à radiação UVB. Após o primeiro dia de exposição à radiação UVB, nós observamos um aumento da atividade da CAT na região de retina. No entanto, após 15 e 30 dias de exposição, nós observamos uma diminuição na atividade da CAT. Vega & Pizzaro (2000) trabalhando com *Daphnia longispina* verificaram um aumento na atividade da catalase após exposição aguda à radiação UVB ($0,11 \text{ J/cm}^2$). Assim como observado por Vargas e colaboradores (2010) que viram um aumento na atividade da catalase após exposição à doses elevadas ($1,2 \text{ J/cm}^2$) a radiação UVB no caranguejo *N. granulata*. Estes resultados confirmam nossos

achados, pois, após a exposição a radiação UVB, a atividade da CAT aumentou no primeiro dia. Assim, o aumento na concentração de EROs, pode ter ativado o sistema de defesa antioxidante. No entanto, a diminuição na atividade da CAT após 15 e 30 dias pode estar relacionado com os efeitos indiretos da radiação UV no sistema visual como sugerido por Zigman e colaboradores (1996), que remetem que a formação do oxigênio singlet e o radical hidroxila, após a exposição a radiação UV, poderia estar induzindo uma inibição da atividade da catalase nas células epiteliais da lente de coelhos e esquilos.

Uma das enzimas responsáveis por realizar a defesa antioxidante é a GST. Esta enzima está presente em praticamente todos os animais, constituindo um importante mecanismo intracelular de desintoxicação (Papadopoulos et al., 2004). Neste estudo, observamos um aumento na atividade da GST em ambas as regiões estudadas, após o primeiro dia de exposição. No entanto, na região da retina, após 15 dias de exposição houve uma diminuição da atividade da GST. Hollmann e colaboradores (2015) observaram a atividade da GST aumentada no pedúnculo do caranguejo *Ucides cordatus* após um dia de exposição, no entanto, esta atividade foi diminuída no terceiro e quinto dia de exposições. Kim e colaboradores (2015) verificaram um aumento na atividade da GST no copépodo *Tigriopus japonicus* após a exposição à radiação UVB. Também trabalhando com *Tigriopus japonicus*, Rhee e colaboradores (2012) verificaram um aumento da atividade da GST após 48h de exposição a radiação UVB (1,2 J/cm²). Estes resultados confirmam nossos achados, pois 1 dia de exposição à radiação UVB estimula um aumento na atividade da GST nos crustáceos. Porém, em exposições mais prolongadas como 15, 30 e 60 dias podem provocar a desativação da GST, o que, neste trabalho, foi mais pronunciado após 15 dias, causando um decréscimo na atividade da GST.

Para verificar os danos desencadeados pela radiação UV no sistema visual do caranguejo *N. granulata*, verificamos os níveis de lipoperoxidação. No primeiro dia de exposição à radiação UV, observamos uma diminuição nos níveis de LPO na região de gânglio. Já após 15 dias de exposição, observamos uma diminuição nos níveis de LPO na região da retina. Contrariamente ao nosso trabalho, Hollmann e colaboradores (2015) observaram, no pedúnculo, um aumento nos níveis de LPO após um dia de exposição à radiação UVB. Já no quinto dia de exposição, os autores observaram diminuição nos níveis de LPO quando comparados ao grupo controle. De acordo com os autores, o tempo de exposição pode não ter sido suficiente para que os mecanismos de defesa revertam os níveis de LPO. O fato de não encontrarmos danos oxidativos, após os períodos longos de exposição, pode estar relacionado com o sistema de defesa que busca combater os danos desencadeados através da exposição crônica à radiação UVB.

Exposições agudas e crônicas podem desencadear diferentes respostas dependendo do tecido estudado. Neste sentido, o sistema visual do caranguejo *N. granulata*, além de ser um tecido constantemente exposto à radiação UV, pode ser afetado diretamente pelos efeitos desencadeados pela exposição crônica à radiação UVB. Sendo assim, no nosso trabalho, nós observamos diferenças no *status oxidativo* dos animais expostos por 1 ou 60 dias, tanto na região da retina como na região de gânglios ópticos.

No primeiro dia de exposição, a retina apresentou um aumento na concentração de EROs, bem como, um aumento na atividade da CAT e GST, que são enzimas antioxidantes responsáveis pela proteção tecidual. No entanto, os níveis de ACAP e LPO não apresentaram diferenças significativas entre os animais expostos à radiação UVB e os grupos controles. Neste sentido, mesmo com aumento na concentração de EROs na retina, e a não alteração dos níveis de ACAP, não observamos dano lipídico (LPO), uma vez que as atividades da CAT e GST estavam aumentadas. Já na exposição crônica por

60 dias, não observamos diferenças significativas na concentração de EROs, na atividade da CAT, na atividade da GST e nos níveis de LPO na retina dos animais expostos com relação aos respectivos grupos controles. No entanto, podemos constatar que os níveis de ACAP aumentaram nesta região. Sendo assim, o aumento da ACAP observado nesta região após 60 dias de exposição à radiação UVB, poderia proteger o tecido dos danos de LPO. Assim, parece que o sistema de defesa antioxidante no sistema visual do caranguejo *N. granulata* foi ativado após a exposição crônica da radiação UVB, protegendo este tecido de possíveis danos celulares, como os danos lipídicos.

Na região de gânglio, não observamos alterações na concentração de EROs, níveis de ACAP e na atividade da CAT, entre os animais expostos e os grupos controles, após o primeiro dia de exposição. No entanto, observamos o aumento da atividade da GST e uma consequente diminuição dos níveis de LPO. Assim, a diminuição dos níveis de LPO na região de gânglio dos animais expostos à radiação UVB está diretamente relacionada ao aumento da atividade da GST, que é uma enzima do sistema de defesa antioxidante, responsável por remover produtos celulares danificados, como os fosfolípidios de membrana (Storey, 1996). Já na região do gânglio dos animais expostos à radiação UVB por 60 dias, não observamos diferenças significativas nos níveis de ACAP e LPO, bem como na atividade da CAT e na atividade da GST. Por outro lado, constatamos um aumento na concentração de EROs. Neste sentido, o fato do aumento na concentração de EROs não ter gerado LPO, pode estar relacionado com o aumento da atividade de outras enzimas antioxidantes como a GPx e a SOD após 60 dias de exposição crônica à radiação UVB.

Os efeitos desencadeados pela exposição à radiação UV à níveis estruturais no sistema visual são conhecidos (Busch et al., 1999; Gorgels e van Norren., 1995; Zigman e Vaughan 1974). Entretanto, neste trabalho, observamos uma alteração estrutural na

região de gânglio, e uma reação inflamatória na região da retina após 60 dias de exposição. Este fato nos remete a entender que exposições a longo prazo podem alterar significativamente as funções fisiológicas do sistema visual de crustáceos. Reações inflamatórias no sistema visual de mamíferos após a exposição crônica à radiação UV, também foram identificadas mais recentemente por Hiramoto e colaboradores (2017). Segundo estes autores, a reação inflamatória foi desencadeada pelo aumento da concentração de EROs estimulada pela radiação UV. Assim, em nosso trabalho, mesmo não identificando um dano de LPO após exposição crônica à radiação UV, nós podemos verificar um processo inflamatório no sistema visual do caranguejo *N. granulata*, o que mostra que existe um processo danoso desencadeado pela exposição crônica à radiação UV.

Perspectivas

O aprofundamento dos conhecimentos acerca dos efeitos desencadeados pela radiação UV tornam-se necessários. Além disto, vimos neste trabalho como o sistema visual do caranguejo *N. granulata* pode responder à doses baixa da radiação UVB, porém, trabalhando com doses mais elevadas, tanto UVA como UVB, podem acarretar em efeitos mais pronunciados no *status* oxidativo e alterações morfológicas? Sendo assim, buscar entender processos não enzimáticos, como o papel da melatonina para combater possíveis danos desencadeados pela exposição crônica da radiação UV também são relevantes, uma vez que mesmo não observando dano de LPO no presente trabalho, podemos observar alterações nos níveis de ACAP nas diferentes regiões do sistema visual de crustáceos.

Conclusões

Neste trabalho, podemos verificar que exposições crônicas da radiação ultravioleta (UVB), sobre o sistema visual do caranguejo *N. granulata* podem acarretar consequências danosas para o organismo, pois, foram observadas alterações no *status oxidativo* do sistema visual do caranguejo *N. granulata*, porém não desencadeando dano de LPO, principalmente pelo aumento da atividade do sistema de defesa antioxidante. No entanto, após 60 dias de exposição, observamos um processo inflamatório e uma desorganização estrutural no sistema visual. Este fato nos remete a entender que exposições a longo prazo podem alterar significativamente as funções fisiológicas do sistema visual de crustáceos desencadeado pela exposição crônica à radiação UV.

Bibliografia Geral:

- Ajani, U.A., Seddon, J.M., Hsieh, C.C., Egan, K.M., Albert, D.M., Gragoudas, E.S., 1992. Occupation and risk of uveal melanoma. An exploratory study. *Cancer*. 70, 2891–2900
- Albert, M.R., Ostheimer, K.G., 2003. The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure: part 2. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 48, 909–918.
- Allodi, S., Santos, L.M.S., Silva, S.F., 1995. Histological study of the visual system in the decapod crustacean *Macrobrachium rosenbergii*. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. 12, 14-22.
- Angelett, S., Cervellini, P.M., 2015. Population structure of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) in a southwestern Atlantic salt marsh. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 43, 539-547.
- Balogh, T.S., Velasco, M.V.R., Pedriali, C.A., Kaneko, T.M., Baby, A.R., 2011. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 86, 732-742.
- Bayne, A.C., Mockett, R.J., Orr, W.C., Sohal, R.S., 2005. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and ageing in transgenic *Drosophila*. *Biochemical Journal*. 391, 277–284.
- Bianchini, A., Lauer, M.M., Nery, L.E.M., Colares, E.P., Monserrat, J.M., dos Santos Filho, E.A., 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 151, 423-436.
- Busch, E.M., Gorgels, T.G., Van Norren, D., 1999. Temporal sequence of changes in rat retina after UV-A and blue light exposure. *Vision Research*. 39, 1233-1247.

- Carvalho, M.H.C., 2008. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior*. 3, 156-165.
- Corrêa, M.P., 2015. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 90, 297-313.
- Davie, P.J.F., Guinot, D., Ng, P.K.L., 2015. Systematics and classification of Brachyura. *Crustacea*. 9C, 1049-1130.
- Diffey, B.L., 2002. What is light?. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 18, 68-74.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Coroneo, M.T., Wakefield, D., 2004. Pathogenesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Progress in Retinal and Eye Research*. 23, 195-228.
- Eboh, A.S., 2014. Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*. 2, 110-118.
- Fabo, E.C., Noonan, F.P., Fears, T., Merlino, G., 2004. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Research*. 64, 6372-6376.
- Gallagher, R.P., Lee, T.K., 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 92, 119-131.
- Gaten, E., 1998. Optics and phylogeny: is there an insight? The evolution of superposition eyes in the Decapoda (Crustacea). *Contributions to Zoology*. 67, 223-236.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P.G., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8, 722-728.

- Golu, A., Gheorghisor, I., Bălăsoiu, A.T., Baltă, F., Osiac, E., Mogoantă, L., Bold, A., 2013. The effect of ultraviolet radiation on the cornea-experimental study. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 54, 1115-1120.
- González, S., Fernández-Lorente, M., Gilaberte-Calzada, Y., 2008. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*. 26, 614-626.
- Gorgels, T.G., van Norren, D., 1995. Ultraviolet and green light cause different types of damage in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 36, 851-863.
- Gouveia, G.R., Marques, D.S., Cruz, B.P., Geracitano, L.A., Nery, L.E., Trindade, G.S., 2005. Antioxidant Defenses and DNA Damage Induced by UV-A and UV-B Radiation in the Crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochemistry and Photobiology*. 81, 398-403.
- Grassé, P.P., Poisson, R.A., Tuzet, O., 1976. *Zoologia. I. Invertebrados*. P.P. Grasse ed. Toray-Masson, S.A., Barcelona.
- Hardeland, R., 2008. Melatonin, hormone of darkness and more—occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 2001-2018.
- Hermes-Lima, M., 2004. *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals*. In: Storey, K.B., *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 1st ed., John Wiley & Sons, New York, p. 319-368.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Larson, A., 2004. *Princípios Integrados de Zoologia*. 11^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 846 p.
- Hill, R.W., Gordon, A.W., 2012. *Fisiologia animal*. 2^a edição. Porto Alegre: Artmed. 894 p.
- Hiramoto, K., Yamate, Y., Sato, E.F., 2017. Long-Term ultraviolet A eye irradiation causes retina denaturation in mice. *Biomedicine Hub*. 2, 5-5.

- Hollmann, G., de Jesus Ferreira, G., Geihs, M.A., Vargas, M.A., Nery, L.E.M., Leitão, Á., Linden, R., Allodi, S., 2015. Antioxidant activity stimulated by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquatic Toxicology*. 160, 151-162.
- Hollmann, G., Linden, R., Giangrande, A., Allodi, S., 2016. Increased p53 and decreased p21 accompany apoptosis induced by ultraviolet radiation in the nervous system of a crustacean. *Aquatic Toxicology*. 173, 1-8.
- Holly, E.A., Aston, D.A., Char, D.H., Kristiansen, J.J., Ahn, D.K., 1990. Uveal melanoma in relation to ultraviolet light exposure and host factors. *Cancer Research*. 50, 5773-5777.
- Huebner, J.D., Loadman, N.L., Wiegand, M.D., Young, D.L., Warszycki, L.A., 2009. The effect of chronic exposure to artificial UVB radiation on the survival and reproduction of *Daphnia magna* across two generations. *Photochemistry and Photobiology*. 85, 374-378.
- Jason, C., Yam, S., Alvin, K., Kwok, H., 2014. Ultraviolet light and ocular diseases. *International Ophthalmology*. 34, 383-400.
- Jones, D.P., 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8, 1865–1879.
- Kim, B.M., Rhee, J.S., Lee, K.W., Kim, M.J., Shin, K.H., Lee, S.J., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2015. UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 167, 15-23.
- Land, M.F., Nilsson, D.E., 2012. *Animal eyes*. Oxford University Press. 291 p.
- Lassen, N., Black, W.J., Estey, T., Vasiliou, V., 2008. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19, 100-112.

- Liao, A.C., Craver, B.M., Tseng, B.P., Tran, K.K., Parihar, V.K., Acharya, M.M., Limoli, C.L., 2013. Mitochondrial-targeted human catalase affords neuroprotection from proton irradiation. *Radiation Research*. 180, 1-6.
- Matsumura, Y., Ananthaswamy, H.N., 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195, 298-308.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M.P., Correa, G., Ono, Y., Goodarzi, H., 2010. Light, including ultraviolet. *Journal of Autoimmunity*. 34, J247-J257.
- McCarty, C.A., Taylor, H.R., 2002. A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts. In: *Progress in Lens and Cataract Research*. Karger Publishers. pp. 21-31.
- McKenzie, R.L., Aucamp, P.J., Bais, A.F., Björn, L.O., Ilyas, M., 2007. Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 6, 218-231.
- Melzer, R.R., Diersch, R., Nicastro, D., Smola, U., 1997. Compound eye evolution: highly conserved retinula and cone cell patterns indicate a common origin of the insect and crustacean ommatidium. *Naturwissenschaften*. 84, 542-544.
- Miguel, N.C.D.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.D.O., Meyer-Rochow, V.B., Allodi, S., 2003. A structural study of the retinal photoreceptor, plexiform and ganglia cell layers following exposure to UV-B and UV-C radiation in the albino rat. *Micron*. 34, 395-404.
- Miguel, N.C.D.O., Wajsenzon, I.J.R., Takiya, C.M., de Andrade, L.R., Tortelote, G.G., Einicker-Lamas, M., Allodi, S., 2007. Catalase, Bax and p53 expression in the visual

- system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell and Tissue Research*. 329, 159-168.
- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., Tananaki, C., 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 139, 93-97.
- Pinheiro, M.A.A., Santana, W., Boos, H., Matsunaga, A.M.F., Lianos, L., 2016. Avaliação do Caranguejo *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Decapoda: Varunidae). Cap. 34: p. 459-466. In: Pinheiro, M. & Boos, H. (Org.), Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS, Sociedade Brasileira de Carcinologia - SBC, 466 p.
- Rhee, J.S., Kim, B.M., Choi, B.S., Lee, J.S., 2012. Expression pattern analysis of DNA repair-related and DNA damage response genes revealed by 55K oligomicroarray upon UV-B irradiation in the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 155, 359-368.
- Ribeiro-Costa, C.S., Rocha, R.M., 2006. Invertebrados: Manual de Aulas Práticas. 2ª edição. Ribeirão Preto: Holos. 271 p.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2005. Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. 7ª edição. São Paulo: Roca. 1145 p.
- Sakai, K., Türkay, M., Yang, S.L., 2006. Revision of the *Helice/Chasmagnathus* complex (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*. 565, 1-77.

- Sandeman, D., Sandeman, R., Derby, C., Schmidt, M., 1992. Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. *The Biological Bulletin*. 183, 304-326.
- Schoenemann, B., 2013. The eyes of a tiny 'Orsten' crustacean – A compound eye at receptor level?. *Vision Research*. 76, 89-93.
- Seddon, J.M., Gragoudas, E.S., Glynn, R.J., Egan, K.M., Albert, D.M., Blitzer, P.H., 1990. Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma: a case-control study. *Archives of Ophthalmology*. 108, 1274-1280.
- Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, J.L., Mydlarski, M.B., Schipper, H.M., 2008. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radical Biology and Medicine*. 45, 1047-1055.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*. 91, 31-38.
- Sliney, D.H., 2001. Photoprotection of the eye – UV radiation and sunglasses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 64, 166–175.
- Spivak, E.D., 2010. The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*. 64, 149-154.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29, 1715-1733.
- Threlfall, T.J., English, D.R., 1999. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve. *American Journal of Ophthalmology*. 128, 280-287.
- Timares, L., Katiyar, S.K., Elmetts, C.A., 2008. DNA damage, apoptosis and Langerhans cells — activators of UV-induced immune tolerance. *Photochemistry and Photobiology*. 84, 422–436.

- Tong, L., Chuang, C.C., Wu, S., Zuo, L., 2015. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters*. 367, 18-25.
- Tucker, M.A., Shields, J.A., Hartge, P., Augsburger, J., Hoover, R.N., Fraumeni Jr, J.F., 1985. Sunlight exposure as risk factor for intraocular malignant melanoma. *New England Journal of Medicine*. 313, 789-792.
- Vajdic, C.M., Kricger, A., Giblin, M., McKenzie, J., Aitken, J., Giles, G.G., Armstrong, B.K., 2001. Eye color and cutaneous nevi predict risk of ocular melanoma in Australia. *International Journal of Cancer*, 92, 906-912.
- Vargas, M.A., Geish, M.A., Maciel, F.E., Cruz, B.P., Filgueira, D.M.V.B., de Jesus Ferreira, G., Nery, L.E.M., Allodi, S., 2010. Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 151, 343-350.
- Vargas, M.A., Geihs, M.A., Maciel, F.E., Cruz, B.P., Nery, L.E.M., Allodi, S., 2011. The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulata*: a protective role of melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 154, 427-434.
- Vega, M.P., Pizarro, R.A., 2000. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 54, 121-125.
- Welch, C. The ozone hole. Disponível em: <
<http://theozonehole.com/ozonedestruction.htm>>. Acesso em: 28 de junho de 2017.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Meewes, C., Wlaschek, M., Peters, T., Blaudschun, R., Ma, W., Kuhr, L., Schneider, L., Scharffetter-Kochanek, K., 2001. UV-induced oxidative stress and photoaging. *Current Problems in Dermatology*. 29, 83-94.

- Ye, Z.W., Zhang, J., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1850, 1607-1621.
- Zhou, W.P., Zhu, Y.F., Zhang, B., Qiu, W.Y., Yao, Y.F., 2016. The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of pterygia. *Molecular Medicine Reports*. 14, 3-15.
- Zigman, S., Vaughan, T., 1974. Near-ultraviolet light effects on the lenses and retinas of mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 13, 462-465.
- Zigman, S., Reddan, J., Schultz, J.B., McDaniel, T., 1996. Structural and Functional Changes in Catalase Induced by Near-UV Radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 63, 818-824.