

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**Caroline Peripolli dos Santos**

**IMPACTO DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A APTIDÃO E  
CAPACIDADE LOCOMOTORA DE GIRINOS**

Santa Maria, RS  
2016

**Caroline Peripolli dos Santos**

**IMPACTO DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A APTIDÃO E CAPACIDADE  
LOCOMOTORA DE GIRINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

Orientador: Prof. Dr. André Passaglia Schuch

Santa Maria, RS

2016

**Caroline Peripolli dos Santos**

**IMPACTO DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A APTIDÃO E CAPACIDADE  
LOCOMOTORA DE GIRINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Sistemática e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biodiversidade Animal**.

**Aprovado em 22 de março de 2016:**

---

**André Passaglia Schuch (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Alexandro Marques Tozetti (UNISINOS)**

---

**Tiago Gomes dos Santos (Unipampa)**

Santa Maria, RS  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. André Passaglia Schuch, pela paciência, pelo incentivo e por todo o aprendizado que me proporcionou desde o início desse projeto.

À FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao querido Sidnei Santos da Cruz, secretário do curso de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, por ouvir e resolver atentamente todos os “pepinos” que brotaram durante esse período.

Ao James Eduardo Lago Londero, pelos lanches e trabalhos compartilhados no laboratório.

Ao LabDros e ao Dr. Elgion Lucio da Silva Loreto, pelos equipamentos cedidos e pela colaboração com a alimentação dos imagos.

A bióloga Sinara Santos Jardim, pela disposição, ajuda de sempre e pelos conselhos compartilhados.

Ao Laboratório de Herpetologia da UFSM e a Dra. Sonia Zanini Cechin, pelo empréstimo de equipamentos e colaboração. Às biólogas Luiza Loebens e Livia Bataioli Moura, pela confecção e análise das lâminas histológicas. E pelos sambinhas da vida também, Livia.

À grandiosa oportunidade de conhecer e coletar na Estação Ecológica do Taim, na Base Santa Marta, lugar extremamente intrigante e encantador. E, obviamente, ao biólogo Mauricio Beux dos Santos, pela parceria nessa empreitada e em muitas outras.

Aos meus amigos, inspiradores e incansáveis, por não deixarem que eu me desequilibrasse e sempre me fortalecerem. Aos meus amigos biólogos, em particular, por sonharem um sonho junto, sentirem e sofrerem por ele também.

Em especial, à Bárbara Kuhn por espichar essa mãozinha de fada e me trazer de volta algumas vezes. Obrigada!

À Luiza Casanova Machado e à Camila Moresco Possebon por toda ajuda nos últimos minutos, por sempre me acolherem e pelas grandes comemorações.

E principalmente à minha família, por estar excepcionalmente presente na minha vida e me sustentar em cada desafio.

À minha mãe, Simone Felin Peripolli, por estar sempre lá na frente, ser impecável em tudo que faz e, ainda, ser minha melhor amiga. Obrigada por me fazer sonhadora!

Ao meu pai, Celso Baltazar Leal dos Santos, pelo alicerce cuidadosamente alinhado, por simplificar e pelo amor à natureza. Obrigada por me fazer aventureira!

Ao meu irmão mais lindo desse mundo, Guilherme Peripolli dos Santos, por ser meu par, meu lar e me inspirar todos os dias.

Não poderia deixar de agradecer às vidas utilizadas para o desenvolvimento desse projeto e seus resultados. Certamente cada girino da espécie *Hypsiboas pulchellus* coletado foi fundamental para composição desse estudo e dos que ainda virão.

E, por fim, agradeço a todos os encontros e as incontáveis trocas que esses dois anos de pós-graduação me proporcionaram, foi extremamente enriquecedor.

## RESUMO

### IMPACTO DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A APTIDÃO E CAPACIDADE LOCOMOTORA DE GIRINOS

AUTORA: Caroline Peripolli dos Santos  
ORIENTADOR: André Passaglia Schuch

Durante as últimas décadas, as populações de anfíbios vêm sofrendo um declínio generalizado e diferentes fatores são sugeridos como responsáveis por esse efeito. Observações paralelas entre o rápido decréscimo da concentração do ozônio estratosférico no final da década de 1970, com o declínio de anfíbios no início da década de 1980, despertaram grande interesse para se estudar as possíveis associações entre o aumento da incidência de radiação ultravioleta (UV) na superfície e a redução do número de espécies de anfíbios. Sabe-se que a radiação UV solar tem importante impacto biológico na vida dos organismos devido a sua grande capacidade de induzir lesões na molécula de DNA, que podem levar a indução de mutações ou morte celular. Um dos principais mecanismos de reparo de DNA é a fotorreativação que ocorre por meio das enzimas fotoliasas, as quais promovem reversão dessas lesões ao absorver fótons de luz UVA e luz visível. Neste projeto, avaliou-se a ação biológica da radiação UVB e UVA a partir de dados morfológicos, histológicos, locomotores e de sobrevivência de girinos da espécie *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). Girinos coletados e mantidos no laboratório foram submetidos a tratamentos agudos e crônicos, compostos por exposições a diferentes doses de luz UVB e UVA. Os resultados de sobrevivência indicam que os girinos de *H. pulchellus* são muito sensíveis à radiação UVB em relação à UVA. Entretanto, apesar da alta sobrevivência dos indivíduos submetidos à radiação UVA, estes apresentaram sérias malformações em longo prazo. A massa corporal dos girinos também sofreu influência das diferentes doses de radiação UV aplicadas, entretanto o comprimento total foi pouco influenciado. A capacidade locomotora (vertical e horizontal) dos organismos expostos à luz UV foi bastante alterada, onde se destaca a grave redução da atividade locomotora dos indivíduos tratados com radiação UVB. Adicionalmente, a radiação UVB teve impacto severo nas estruturas de queratina da pele (estrato córneo) e da boca (queratodontes e mandíbula) dos girinos, indicando que esses devem ser impactos principais da radiação UV solar na redução da performance desses organismos. Em paralelo, também foi possível observar a extrema importância da ativação das enzimas fotoliasas para a reparação dos danos de DNA, assim como os seus efeitos após os tratamentos com radiação UVB, mas não com UVA. Portanto, no presente trabalho, foi possível apresentar uma ampla caracterização dos efeitos biológicos da radiação UVB e UVA solar na performance de girinos de *H. pulchellus*.

**Palavras-chave:** Declínio de anfíbios. Radiação ultravioleta. Performance locomotora. *Hypsiboas pulchellus*.

## ABSTRACT

### SOLAR RADIATION IMPACT ON TADPOLES' FITNESS AND LOCOMOTION PERFORMANCE

AUTHOR: Caroline Peripolli dos Santos

ADVISOR: André Passaglia Schuch

On the last decades, amphibian populations have been suffering a global decline, and different factors can be related to this process. Parallel observations between the decrease of stratospheric ozone concentration in the late 1970s and amphibian decline in early 1980s aroused interest to study the possible association among increased incidence of ultraviolet radiation (UV) and amphibian decline. The UV radiation has important biological impact on living organisms due to their ability to induce lesions in the DNA molecule, which may result in the induction of mutations or cell death. Photoreactivation is an important DNA repair mechanism that promotes the reversal of UV-induced DNA damage by photolyase enzymes after the absorption of UVA and visible light photons. In this study, we evaluated the biological effects of UVB and UVA through morphological, histological, locomotor and survival of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles. Tadpoles kept in the laboratory were submitted to acute and chronic treatments, composed of different doses of UVB and UVA exposures. The results of survival curves indicate that the *H. pulchellus* is very sensitive to UVB radiation comparative to UVA. However, despite the high tadpole survival after UVA, they showed serious malformations after metamorphosis. Tadpoles' body weight also suffered influence of different UV radiation doses, however the body length was bit affected. The locomotor capacity (horizontal and vertical speed) of UVB-exposed tadpoles has been significantly changed. In addition, UVB radiation had severe impact on the skin (*stratum corneum*) and mouth (rows of teeth and jaw sheaths) keratin structures of tadpoles, indicating that these should be important impacts of solar UV radiation in reducing the performance of these organisms. In parallel, it was also possible to observe the extreme importance of activation of photolyases for the repair of DNA damage after treatment with UVB but not UVA. Therefore, in this study, we present a wide characterization of the biological effects of solar UVB and UVA on the performance of *H. pulchellus* tadpoles.

**Key words:** Amphibian decline. Ultraviolet radiation. Locomotor performance. *Hypsiboas pulchellus*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo da ação da enzima fotoliase no reparo de uma molécula de DNA.....	13
<b>Figura 2</b> - Esquema representativo do aparato bucal de <i>Hypsiboas pulchellus</i> . ....	15
<b>Figura 3</b> - Exemplo representativo da canaleta utilizada para os experimentos de deslocamento Horizontal .....	20
<b>Figura 4</b> - Massa corporal dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo) .....	22
<b>Figura 5</b> - Massa corporal dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo) .....	23
<b>Figura 6</b> - Massa corporal dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Crônico).....	24
<b>Figura 7</b> - Comprimento total dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo) .....	25
<b>Figura 8</b> - Comprimento total dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo) .....	25
<b>Figura 9</b> - Comprimento total dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Crônico) .....	26
<b>Figura 10</b> - Imagens representativas da epiderme (estrato córneo e camada de células) dos indivíduos em diferentes tempos de recuperação após as irradiações com UVB .....	27
<b>Figura 11</b> - Espessura do estrato córneo de indivíduos irradiados com UVB.....	27
<b>Figura 12</b> - Camadas celulares da epiderme de indivíduos irradiados com UVB.....	28
<b>Figura 13</b> - Imagens representativas da epiderme (estrato córneo e camada de células) dos indivíduos em diferentes tempos de recuperação após as irradiações com UVA .....	29
<b>Figura 14</b> - Espessura do estrato córneo de indivíduos irradiados com UVA.....	29
<b>Figura 15</b> - Camadas celulares da epiderme de indivíduos irradiados com UVA.....	30
<b>Figura 16</b> - Imagens representativas do disco oral dos indivíduos irradiados com UVB e UVA.....	30
<b>Figura 17</b> - Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo) .....	31
<b>Figura 18</b> - Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo) .....	33
<b>Figura 19</b> - Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo) .....	34
<b>Figura 20</b> - Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo) .....	34
<b>Figura 21</b> - Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Crônico) .....	35
<b>Figura 22</b> - Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Crônico) .....	36
<b>Figura 23</b> - Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Crônico) .....	37
<b>Figura 24</b> - Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Crônico) .....	38
<b>Figura 25</b> - Sobrevivência dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Agudo).....	39
<b>Figura 26</b> - Sobrevivência dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Crônico) .....	40
<b>Figura 27</b> - Imagens representativas de girinos com malformações irradiados com UVA.....	41



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Esquema representativo do Tratamento Agudo.....	18
<b>Tabela 2</b> - Esquema representativo do Tratamento Crônico.....	18

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	14
	3.1 MODELO DE ESTUDO: <i>Hypsiboas pulcellus</i> (Anuro: Hylidae).....	14
	3.2 COLETA DOS ANIMAIS E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO.....	16
	3.3 EXPOSIÇÃO DOS GIRINOS EM LÂMPADAS DE UVB E UVA: TRATAMENTOS AGUDOS E CRÔNICOS.....	16
	3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	18
	3.5 PERFORMANCE LOCOMOTORA: VELOCIDADES DE DESLOCAMENTO HORIZONTAL E VERTICAL.....	19
	3.6 CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA APÓS OS TRATAMENTOS AGUDO E CRÔNICO DE EXPOSIÇÃO ÀS DOSES DE UVB E UVA.....	20
	3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	21
	4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO UVB E UVA NA MORFOLOGIA DE GIRINOS DE <i>HYPYSIBOAS PULCHELLUS</i> .....	21
	<b>4.1.1 Massa corporal</b> .....	21
	<b>4.1.2 Comprimento total</b> .....	24
	<b>4.1.3 Histologia da epiderme e análises do aparato bucal</b> .....	27
	4.2 IMPACTO DOS TRATAMENTOS COM LUZ UVB E UVA NA PERFORMANCE LOCOMOTORA DE GIRINOS DE <i>H. PULCHELLUS</i> .....	31
	4.3 IMPACTO DOS TRATAMENTOS COM LUZ UVB E UVA NA SOBREVIVÊNCIA DE GIRINOS DE <i>H. PULCHELLUS</i> .....	38
	4.4 MALFORMAÇÕES.....	41
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos atuais mostram que a biodiversidade está em declínio no mundo todo e os anfíbios são importantes representantes dessa perda geral de populações, especialmente porque são consideradas espécies indicadoras da saúde ambiental global (ALFORD, 2011; COLLINS, 2003; HOULAHAN, 2000). Desde meados de 1980, estudos que demonstram decréscimo de populações de anfíbios começaram a surgir, inicialmente na América do Norte. Entretanto, nas últimas décadas essas observações expandiram-se por diferentes países, o que caracteriza um possível declínio generalizado das populações de anfíbios, que pode estar relacionado à extinção de muitas espécies em diferentes locais do planeta (ETEROVICK, 2005; HOULAHAN, 2000; SHERMAN, 1993; STUART, 2004). Atualmente inúmeros fatores são sugeridos como principais causas da redução de populações de anfíbios, como aumento da incidência de radiação UVB na superfície (ALTON, 2012; BLAUSTEIN, 1993; 1994; SCHUCH, 2015a), fragmentação e destruição de habitats (BECKER, 2007), exposição a produtos químicos e pesticidas (BRÜHL, 2013; SVARTZ, 2014), assim como ao fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, causador da doença quitridiomicose (BERGER, 1999; LIPS, 2006).

Alguns desses fatores podem levar a sérias alterações em estruturas fundamentais para o desenvolvimento e a sobrevivência desses organismos, como é o caso da doença quitridiomicose. O fungo causa infecções na pele e pode desencadear excessiva produção de queratina, hiperqueratose, descamação e erosões na epiderme. Esses animais tem seu comportamento alterado pela doença, tornam-se moribundos e morrem frequentemente poucos dias após apresentarem os primeiros sintomas (BERGER, 1999). A radiação ultravioleta é amplamente absorvida pela epiderme e portanto também pode desencadear alterações estruturais na pele, pois induz a condensação de filamentos intermediários de queratina que modifica o teor de lipídios no estrato córneo, aumenta a fluidez lipídica e sua permeabilidade. Segundo NAGL (1997) a radiação UVB pode causar inchaço gradual de células epiteliais e seus núcleos, o que causa um aumento na espessura média da epiderme em girinos irradiados.

A radiação ultravioleta (UV) é a radiação eletromagnética com comprimento de onda de 100nm a 400nm e maior frequência de oscilação, quando comparada a

luz visível e a radiação infravermelha. Quase toda a radiação emitida pelo sol concentra-se entre essas faixas: ultravioleta, visível e infravermelha. O espectro do ultravioleta é subdividido e algumas de suas regiões recebem denominações, como UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). Atualmente, a proporção total de radiação UV incidente na superfície terrestre é de aproximadamente 6%. Sua maior parte, cerca de 90%, é constituída pela radiação UVA, a qual é pouco absorvida pelo ozônio estratosférico e, dessa forma, é a que mais atinge a superfície. A radiação UVB, entretanto, é fortemente absorvida pela estratosfera, além de ser amplamente espalhada e atenuada, mas ainda atinge em pequenas proporções a biosfera. A radiação UVC é completamente absorvida pela estratosfera e não atinge a superfície terrestre. Contudo, a redução da camada de ozônio pode levar a mudanças em sua distribuição espectral e aumentar a incidência de UVB e, conseqüentemente, seus efeitos sobre a vida terrestre (FRIEDBERG, 2006; GALLAGHER, 2006).

A partir de importantes observações entre o rápido decréscimo da concentração do ozônio estratosférico no final da década de 1970, juntamente com estudos sobre o declínio das populações de anfíbios no início da década de 1980, despertou-se um grande interesse científico para se avaliar as possíveis associações entre o aumento da incidência de radiação UVB na superfície e a redução do número de espécies de anfíbios (CRUMP, 2000; FARMAM, 1985). Em 2004 foi demonstrado que espécies que vivem na região neotropical são mais afetadas pelo declínio de anfíbios do que em outras regiões. Na América do Sul, Mesoamérica, Porto Rico e Austrália a principal causa da redução do número de espécies ainda é enigmática (STUART, 2004). Adicionalmente, a família Hylidae está entre as quatro principais famílias em declínio ao redor do globo. Espécies da família Hylidae apresentam alta sensibilidade aos efeitos da radiação UV, logo, é possível que o declínio dessas espécies na região sul esteja relacionado à ocorrência de eventos que influenciam a ação do buraco de ozônio Antártico sobre o sul do Brasil (SCHUCH, 2015a).

Em paralelo a essas descobertas, a ocorrência de malformações em anuros passou a ser percebida, inicialmente em regiões dos Estados Unidos (DRAKE, 2007; JOHNSON, 2001) e, posteriormente, em outros países ao redor do globo (ROY, 2002; AGOSTINI, 2013). A radiação UVB é considerada um possível fator responsável por induzir malformações, além de mortalidade, especialmente devido à

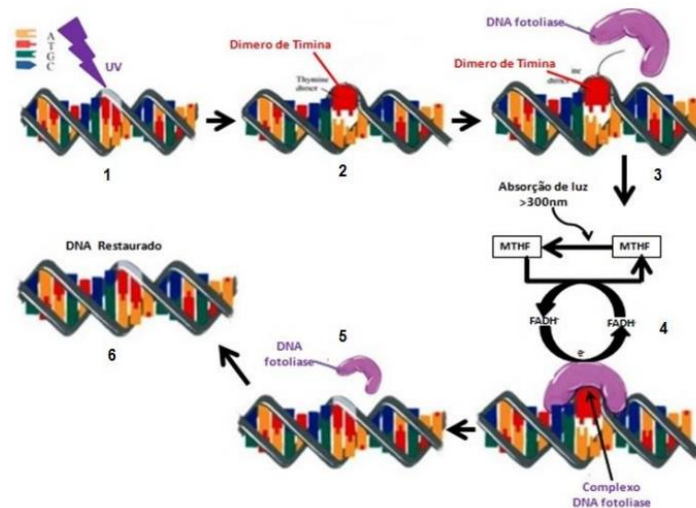
sua ação mutagênica no estágio de desenvolvimento embrionário e larval desses organismos (MACIAS, 2007). Além de demonstrar que os efeitos da radiação UVB na fase embrionária e larval de anfíbios reduzem consideravelmente sua sobrevivência (BANCROFT, 2008; SCHUCH, 2015a), essa descoberta indica que a radiação UVB é um importante estressor ambiental. Seus efeitos na morfologia, no comportamento e na sobrevivência de girinos são de extrema importância para a compreensão da dimensão da ação biológica desse agente genotóxico na vida dos anfíbios, principalmente por causar crescimento reduzido, redução da taxa de desenvolvimento, metamorfose atrasada, redução da capacidade locomotora e suscetibilidade aos predadores e a doenças (ALTON, 2011; BLAUSTEIN, 2003; SCHUCH, 2015a).

A molécula de DNA é responsável pela manutenção e transmissão da informação genética ao longo das gerações. Portanto, é de fundamental importância que esse patrimônio genético seja protegido. Conseqüentemente, é essencial que os agentes com ação genotóxica sejam amplamente conhecidos, assim como suas possíveis alterações na aptidão e sucessão dos organismos na Terra. Ao avaliarmos esses efeitos em maior escala, é inevitável sua associação a eventos de extinção de espécies, uma vez que a vulnerabilidade do material genético a esses agentes, como a radiação solar, pode comprometer irreversivelmente a vida dos organismos e suas gerações futuras.

Um processo de defesa muito importante contra os danos de DNA induzidos pela radiação UV é conhecido como reparação por fotorreativação (Figura 1), que envolve a ativação de enzimas chamadas fotoliasas pela ação da luz visível e UVA. A fotorreativação foi o primeiro mecanismo de reparo de DNA descrito (KELNER; DULBECCO, 1949). Nesse mecanismo, a fotoliase liga-se ao dímero de pirimidina formado no DNA pela ação da luz UV (independente de luz) e, após absorver um fóton de luz UVA/azul (comprimento de onda entre 350 a 450 nm), quebra as ligações covalentes formadas entre as pirimidinas adjacentes, restaurando os nucleotídeos a sua forma nativa. Desta forma, trata-se de um mecanismo de reparo de DNA altamente eficiente, rápido e livre de erro. Pelo fato da fotorreativação ser, muito provavelmente, o mais importante mecanismo de reparação de DNA de anfíbios, foi demonstrado que espécies com maior atividade das fotoliasas são mais resistentes aos danos provocados pela luz UV (BLAUSTEIN, 1994). Dessa maneira, é importante conhecermos a eficiência desse mecanismo de reparo nos efeitos da

radiação UV na morfologia, na locomoção e na sobrevivência de diferentes espécies de anuros.

Figura 1 – Esquema representativo da ação da enzima fotoliase no reparo de uma molécula de DNA



Fonte: (NHAVENE, 2014).

Análises morfológicas e comportamentais sobre os efeitos da radiação solar na fase larval de espécies de anuros possibilitam compreender suas consequências na vida desses organismos e avaliar em que amplitude esse fator se relaciona com o declínio de espécies de anfíbios. É possível também expandir essas descobertas para outras espécies de anuros e relacionar esses dados à suas diferentes sensibilidades à radiação UV por meio de análises da diminuição de populações e, conseqüentemente, inferir a capacidade dessas espécies em preservar e manter seu material genético entre as gerações. A partir da compreensão desses efeitos em uma espécie amplamente distribuída, inclusive em áreas de grande atividade antrópica (LAJMANOVÍCH, 2012; MOREIRA; 2008), é possível avaliarmos a suscetibilidade desses organismos na natureza.

Apesar do grande avanço científico das pesquisas realizadas nas últimas décadas, poucos estudos demonstram a importância do impacto genotóxico da radiação UV solar na atividade de anfíbios, por meio da caracterização de seus efeitos em suas estruturas morfológicas e na sua capacidade locomotora. Assim como um enfoque ainda menor é dado para os impactos cumulativos da radiação UVA (principal componente da radiação UV solar) nesses organismos,

provavelmente devido à sua menor capacidade de gerar efeitos danosos em curto prazo e pela maior dificuldade de se trabalhar com lâmpadas desse tipo de radiação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis efeitos da radiação UVB e UVA sobre a morfologia, locomoção e sobrevivência de girinos de *Hypsiboas pulchellus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis alterações na morfologia e sobrevivência de girinos de *Hypsiboas pulchellus* após exposição à radiação UVB e UVA.
- Avaliar o efeito da radiação UVB e UVA no aparato bucal e epiderme de girinos de *Hypsiboas pulchellus*.
- Avaliar a atividade locomotora dos girinos de *Hypsiboas pulchellus* sobre efeito da radiação UVB e UVA.
- Avaliar a eficiência e a importância do mecanismo de reparo de DNA por fotorreativação sobre os efeitos da luz UV na morfologia, na locomoção e na sobrevivência de girinos de *Hypsiboas pulchellus*.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 MODELO DE ESTUDO: *Hypsiboas pulchellus* (Anuro: Hylidae)

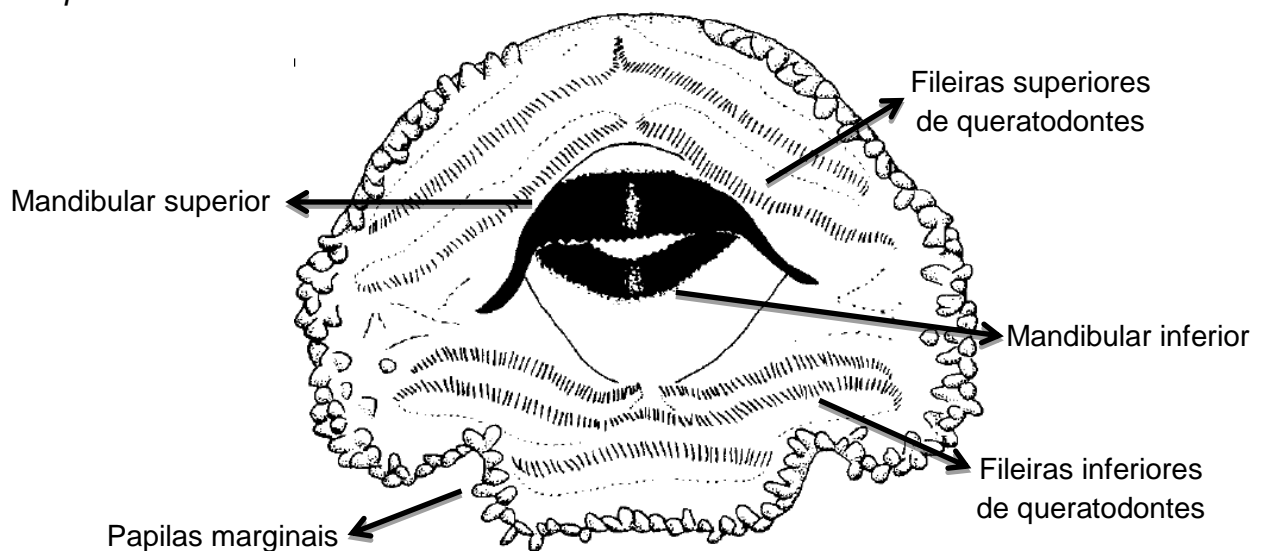
Nesse estudo, utilizamos a espécie *Hypsiboas pulchellus* como modelo experimental, por ser facilmente mantida em laboratório e amplamente distribuída

em regiões da Argentina, do Uruguai, do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, sendo possivelmente encontrada tanto em ambientes abertos (como pastagens e savanas alagadas) como em ambientes de floresta. Essa espécie apresenta reprodução contínua, com apenas três pausas reprodutivas durante o ano. Seus sítios de reprodução podem ser temporários, semi-permanentes ou permanentes, seus ovos são depositados em aglomerados gelatinosos ligados a plantas ou objetos submersos, e após a eclosão seus girinos apresentam atividade bentônica (BOTH, 2011).

Os girinos dessa espécie apresentam corpo oval em vista dorsal e globular deprimido em vista lateral. O focinho também é oval em vista dorsal e arredondado em vista lateral, com narinas grandes posicionadas dorsalmente. Os olhos são grandes e laterais e o espiráculo é longo e estreito, com formato de cone, direcionado posterodorsalmente. A musculatura caudal é larga, de afilamento gradativo. As nadadeiras dorsal e ventral são baixas e seus contornos formam um arco, sua cauda possui extremidade pontuda e sem flagelo.

O disco oral dos girinos dessa espécie é anteroventral, com emarginação lateroventral, e apresenta apenas papilas marginais dispostas lado a lado em fileira única. A fórmula dentária é  $2(2)/3(1)$  ou  $2(1,2)/3(1)$ . Os revestimentos da maxila e da mandíbula são estreitos, sendo o da maxila com formato de M e o da mandíbula com formato de V (GONÇALVES, 2014).

Figura 2 – Esquema representativo do aparato bucal de girinos de *Hypsiboas pulchellus*



Fonte: Adaptado pela autora a partir de KOLENC, 2008.



### 3.2 COLETA DOS ANIMAIS E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

Os girinos de *Hypsiboas pulchellus* foram coletados com puçá de tela de arame (malha de 3 mm<sup>2</sup>), em novembro de 2014, na Estação Ecológica do Taim, mais precisamente na base Santa Marta, distante 110 Km da cidade Santa Vitória do Palmar e 130 Km da cidade Rio Grande.

Após serem transportados até o laboratório somente os girinos dentre os estágios de 25 a 30 (GOSNER, 1960) foram selecionados. Posteriormente, estes indivíduos foram separados aleatoriamente e mantidos em recipientes redondos de 10cm de altura por 14cm de diâmetro (10 indivíduos por *container*) contendo um litro de água sem cloro com temperatura controlada (20°C ±1°C) e alimentados com espinafre cozido *ad libitum*. Para manter a qualidade da água, o volume total dos recipientes foi trocado de dois em dois dias (adaptado de Alton, 2011).

### 3.3 EXPOSIÇÃO DOS GIRINOS EM LÂMPADAS DE UVB E UVA: TRATAMENTOS AGUDOS E CRÔNICOS

As irradiações foram realizadas em laboratório, por meio do uso das lâmpadas de UVB (Vilber Loumart T 15M 15 W, France), filtrada com uma placa de policarbonato (para evitar a passagem de comprimentos de onda de UVC) e de UVA (Osram Ultramed FDA KY10s 1000 W, Germany), filtrada com o filtro Schott BG39 de 3mm de espessura (para evitar a passagem de comprimentos de onda de UVB) (Schott Glass, Germany).

#### a) Tratamento Agudo

Para cada comprimento de onda da luz UV solar foram pré-definidas três diferentes doses, sendo a dose mais alta equivalente a 10% da incidência diária no local de coleta. Cada grupo de 10 indivíduos foi submetido a uma única exposição em uma determinada dose de UVA ou UVB, sendo realizadas três exposições independentes para cada dose aplicada. Imediatamente após as irradiações nas lâmpadas de UVB e UVA, determinados grupos de 10 indivíduos receberam um segundo tratamento de fotorreativação, o qual consistiu em uma segunda exposição de duas horas à duas lâmpadas fluorescentes (lâmpadas GE, 40W cada), à uma distância de 40 cm das mesmas, enquanto outros grupos permaneceram alocados

em recipientes envoltos com papel alumínio, completamente isolados de luz (escuro). O objetivo desse tratamento consistiu em avaliar o mecanismo de reparo de DNA por fotorreativação, responsável pela remoção das lesões de DNA induzidas pelos tratamentos com luz UV e investigar sua eficiência e importância na sobrevivência e na performance dos girinos. Além disso, 20 indivíduos não foram irradiados com luz UV para compor os controles do experimento, sendo metade deles submetida à fotorreativação e a outra metade mantida em recipientes escuros até o final dos experimentos.

Tabela 1 - Esquema representativo do Tratamento Agudo, caracterizando as diferentes doses de UVB e UVA e número de indivíduos submetidos a cada uma delas, com exceção dos controles, que não foram submetidos aos tratamentos com luz UV. Este tratamento foi repetido três vezes, independentemente.

	<b>FOTORREATIVAÇÃO</b>	<b>ESCURO</b>
Controle	(10 indivíduos)	(10 indivíduos)
UVB (doses)	5 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)	5 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)
	2,5 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)	2,5 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)
	1 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)	1 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)
UVA (doses)	250 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)	250 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)
	100 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)	100 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)
	50 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)	50 kJ/m <sup>2</sup> (10 indivíduos)

Fonte: Autora.

#### b) Tratamento Crônico

Cada grupo de 10 indivíduos foi submetido a uma exposição diária individual, durante um período total de cinco dias. Cada irradiação consistiu em exposições equivalentes a 2% da incidência diária de UVB e UVA no local de coleta, o que corresponde a doses de 1 kJ/m<sup>2</sup> de UVB e 50 kJ/m<sup>2</sup> de UVA, diariamente. Assim como no Tratamento Agudo, após as exposições às lâmpadas UV, metade dos indivíduos foi submetida ao tratamento de fotorreativação e a outra metade permaneceu em recipientes escuros por todo o experimento. Também foram mantidos 20 indivíduos não irradiados com luz UV para a composição dos grupos controle do experimento, sendo apenas metade deles submetida à fotorreativação após cada irradiação com luz UVB ou UVA, enquanto a outra metade permaneceu em recipientes escuros.

Tabela 2 - Esquema representativo do Tratamento Crônico, caracterizado por irradiações diárias, no período de cinco dias, com as doses de UVB e UVA acima demonstradas.

Dias de tratamento	1°	2°	3°	4°	5°
Controle (10 ind F/ 10 ind E)	F E	F E	F E	F E	F E
UVB (10 ind F/ 10 ind E)	1 kJ/m <sup>2</sup> F 1 kJ/m <sup>2</sup> E	1 kJ/m <sup>2</sup> F 1 kJ/m <sup>2</sup> E	1 kJ/m <sup>2</sup> F 1 kJ/m <sup>2</sup> E	1 kJ/m <sup>2</sup> F 1 kJ/m <sup>2</sup> E	1 kJ/m <sup>2</sup> F 1 kJ/m <sup>2</sup> E
UVA (10 ind F/ 10 ind E)	50 kJ/m <sup>2</sup> F 50 kJ/m <sup>2</sup> E	50 kJ/m <sup>2</sup> F 50 kJ/m <sup>2</sup> E	50 kJ/m <sup>2</sup> F 50 kJ/m <sup>2</sup> E	50 kJ/m <sup>2</sup> F 50 kJ/m <sup>2</sup> E	50 kJ/m <sup>2</sup> F 50 kJ/m <sup>2</sup> E

Fonte: Autora.

Legenda: 10 ind = 10 indivíduos por tratamento. F = indivíduos expostos à fotorreativação. E = indivíduos mantidos no escuro

### 3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

#### a) Massa corporal e comprimento total

As medidas de massa corporal foram obtidas por meio de uma balança semi-analítica (Shimadzu, BL3200H, Brasil) e o comprimento total foi medido com um paquímetro digital série 500 da Mitutoyo American Corporation com resolução de 0,01mm (Mitutoyo, Brasil). Ambas as medidas de todos os indivíduos analisados foram obtidas antes do 1º dia de tratamento e após 15.

Para a análise desses resultados foi utilizada a razão entre a medida de massa corporal ou comprimento total ao 15ª dia de experimento e seu respectivo valor 24 horas antes da irradiação. Esses valores foram expressos em mudança de vezes (em inglês, *fold change*).

#### b) Análises histológicas da pele e do aparato bucal

Com o objetivo de avaliar os efeitos da radiação UV solar nas estruturas queratinizadas da pele e da boca dos girinos, novos grupos de indivíduos (contendo 6 girinos por grupo) foram irradiados com as doses mais altas de UVB e UVA aqui empregadas (5 kJ/m<sup>2</sup> de UVB e 250 kJ/m<sup>2</sup> de UVA) e posteriormente anestesiados e eutanasiados em diferentes tempos de fixação (6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias).

Para as análises histológicas da pele dos girinos de *Hypsiboas pulchellus*, o corpo de cada girino tratado (ou controle) foi emblocado em posição vertical para

obtenção dos cortes transversais. Os cortes histológicos foram fixados em solução de formol 10% e posteriormente submetidas à rotina histológica: desidratação em uma série crescente de álcool (70, 80, 90 e 99%) e inclusão em resina histológica metacrilato (Leica Historesin kit, Alemanha). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (Leica RM2245, Alemanha) para obtenção de cortes com 2  $\mu$ m de espessura. Os cortes histológicos receberam coloração com hematoxilina-eosina (CAPUTO, 2010). As lâminas foram posteriormente observadas e fotografadas em microscopia de luz (Carl Zeiss Axio Scope. A1 com AxioCam MRC 5, Alemanha) e analisadas por meio do software ZEN lite. Para cada amostra analisada foram feitas 10 medidas microscópicas da espessura do estrato córneo e do número de camadas celulares da epiderme.

Adicionalmente, com o objetivo de avaliar o efeito da radiação solar (UVB e UVA) nas estruturas de queratina da boca, análises do aparato bucal foram realizadas com esses mesmos girinos tratados com luz UVB e UVA. Para essas análises, estes indivíduos foram fotografados com o uso da lupa (Estereomicroscópio Trinocular Zeiss, Discovery.V8 com AxioCam Erc 5, Alemanha) e a disposição das fileiras de dentes e da presença de bico córneo foram, então, avaliadas nas imagens geradas.

### 3.5 PERFORMANCE LOCOMOTORA: VELOCIDADES DE DESLOCAMENTO HORIZONTAL E VERTICAL

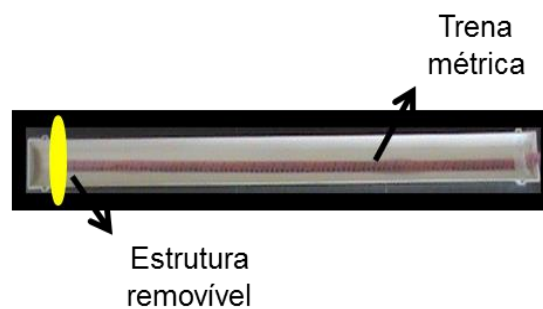
A performance locomotora foi avaliada após ambos os tipos de tratamentos com luz UVB e UVA, descritos nas Tabelas 1 e 2, por meio de medidas das velocidades de deslocamento horizontal e vertical. No Tratamento Agudo, os experimentos locomotores foram realizados no 1º e no 15º dia após as exposições. No Tratamento Crônico, os experimentos foram realizados no 1º dia após a última irradiação, assim como no 15º dia após a última irradiação. Ao todo foram realizadas três medidas independentes das velocidades de deslocamento horizontal e vertical.

#### a) Velocidade de deslocamento horizontal

Nesse experimento, a velocidade de deslocamento horizontal foi calculada por meio de medidas da distância percorrida pelos girinos em função do tempo (cm/s), com a utilização de uma canaleta de um metro de comprimento, preenchida

com 3,0 cm de água sem cloro ( $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), e com uma trena métrica acoplada ao fundo. No início do experimento, uma das extremidades da canaleta permaneceu isolada, com uma estrutura removível, onde os girinos permaneciam por um minuto para aclimação (um por vez). Depois da aclimação, essa estrutura foi removida e imediatamente após foi dado um estímulo mecânico na água, o qual consistiu na queda de uma partícula com massa de aproximadamente 3g, de uma altura de 20 cm. Na Figura 3 é mostrado um exemplo representativo da canaleta utilizada para os experimentos de deslocamento horizontal. Para o cálculo da velocidade horizontal a distância percorrida pelo girino na canaleta, após o estímulo, foi quantificada e o tempo foi cronometrado.

Figura 3 – Exemplo representativo da canaleta utilizada para os experimentos de deslocamento horizontal



Fonte: Autora.

#### b) Velocidade de deslocamento vertical

Imediatamente após o experimento de deslocamento horizontal, os girinos foram transferidos da canaleta para uma proveta de plástico de 500ml preenchida com água sem cloro ( $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Nesse segundo experimento, a velocidade de deslocamento vertical foi calculada por meio de medidas da distância percorrida pelos girinos (do topo até o fundo da proveta) em função do tempo.

### 3.6 CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA APÓS OS TRATAMENTOS AGUDO E CRÔNICO DE EXPOSIÇÃO ÀS DOSES DE UVB E UVA

A sensibilidade dos girinos de *H. pulchellus* à radiação UVB e UVA foi avaliada após a realização dos tratamentos Agudo e Crônico de exposição às lâmpadas UV, descritos nas Tabelas 1 e 2, por meio da contagem de indivíduos vivos até o fim de cada experimento. No tratamento Agudo, os indivíduos foram

observados diariamente por 15 dias; no Tratamento Crônico, os mesmos foram monitorados por 20 dias, a partir da primeira irradiação. Cada tratamento foi repetido três vezes, de modo independente.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as variáveis de resposta como massa corporal, comprimento total, velocidade horizontal e velocidade vertical foram analisadas as seguintes preditoras: 1 kJ/m<sup>2</sup>, 2,5 kJ/m<sup>2</sup> e 5 kJ/m<sup>2</sup> de UVB e 50 kJ/m<sup>2</sup>, 100 kJ/m<sup>2</sup> e 250 kJ/m<sup>2</sup> de UVA, exposição ao tratamento de fotorreativação (ou manutenção no escuro) e tempo de recuperação. Para a espessura do estrato córneo e camadas de células, as preditoras analisadas foram as doses únicas de UVB e UVA, exposição ao tratamento de fotorreativação (ou manutenção no escuro) e diferentes tempos de recuperação e de fixação dos indivíduos (6 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias).

Para avaliar se os tratamentos tiveram efeito sobre os parâmetros descritos acima, os resultados foram testados utilizando uma MANOVA (análise da variância multivariada), seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, EUA). A normalidade dos resíduos foi inspecionada através de análises gráficas.

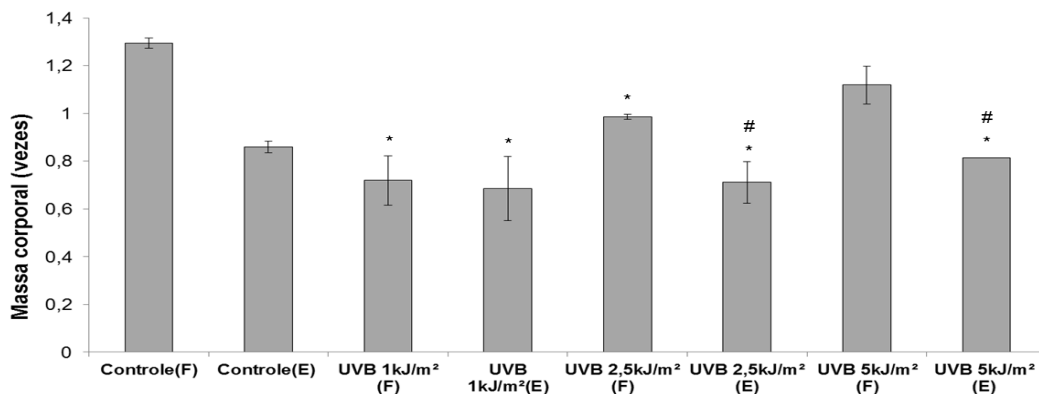
## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO UVB E UVA NA MORFOLOGIA DE GIRINOS DE HYPISIBOAS PULCHELLUS

#### 4.1.1 Massa corporal

##### a) Tratamento Agudo

Figura 4 – Massa corporal dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo)

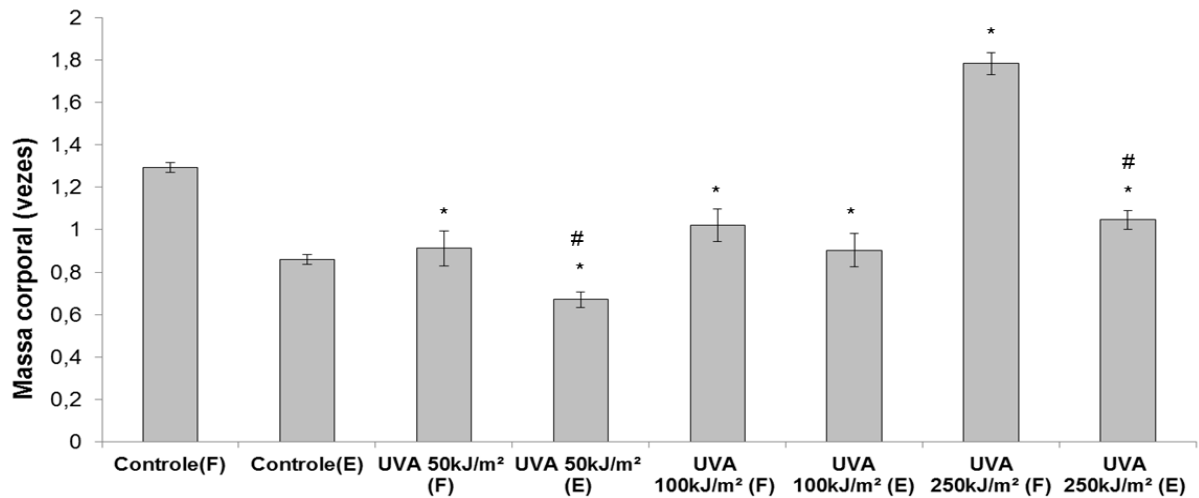


Fonte: Autora.

Legenda: \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ). (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

A partir das comparações entre cada grupo (F ou E) expostos às diferentes doses de UVB com o seu respectivo controle, observa-se que, com exceção do grupo 5 kJ/m<sup>2</sup> (F), todos os grupos irradiados apresentaram uma redução significativa de massa corporal em relação ao controle ( $F_{7,16} = 22,44$ ;  $p < 0,05$ ). De maneira geral, enquanto os indivíduos controles (grupo F e E) apresentaram um aumento na massa de 0,3 vezes após os 15 dias de experimento, os indivíduos expostos à UVB e mantidos no escuro (grupos E) apresentaram uma redução na massa de aproximadamente 0,3 vezes após o mesmo período de análise. Adicionalmente, os girinos irradiados com as doses de 2,5 kJ/m<sup>2</sup> e 5 kJ/m<sup>2</sup> e mantidos no escuro (grupo E) apresentaram massa significativamente menor em relação aos girinos expostos à mesma dose de UVB e ao tratamento de fotorreativação (grupo F), os quais não apresentaram redução de massa em relação à primeira medição. Não foi possível observar uma diferença significativa na massa dos girinos do grupo F irradiados com a menor dose (1 kJ/m<sup>2</sup>) em relação aos girinos irradiados com a mesma dose e mantidos no escuro (grupo E).

Figura 5 – Massa corporal dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo)



Fonte: Autora.

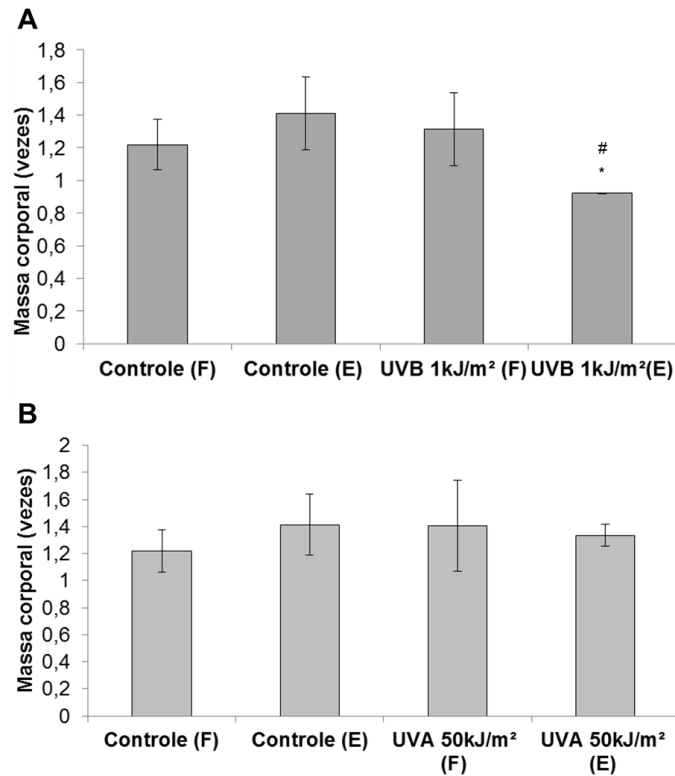
Legenda: \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ). (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Todos os grupos de girinos tratados, seguidos ou não do tratamento de fotorreativação, apresentaram redução na massa corporal em relação aos seus respectivos controles ( $F_{7,16} = 109,8$ ;  $p < 0,05$ ), exceto aqueles irradiados com 250 kJ/m<sup>2</sup> submetidos a fotorreativação, que apresentaram massa maior que o controle. Os girinos irradiados com a lâmpada de UVA e, posteriormente, expostos ao tratamento de fotorreativação (grupos F) apresentaram uma média da massa corporal maior em relação aos girinos irradiados com as mesmas doses, porém mantidos no escuro (grupos E). Essa diferença nos valores das massas foi estatisticamente significativa para as doses de 50 e 250 kJ/m<sup>2</sup>, mas não para a dose intermediária de 100 kJ/m<sup>2</sup>.

## b) Tratamento Crônico



Figura 6 – Massa corporal dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Crônico)



Fonte: Autora.

Legenda: \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ). (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

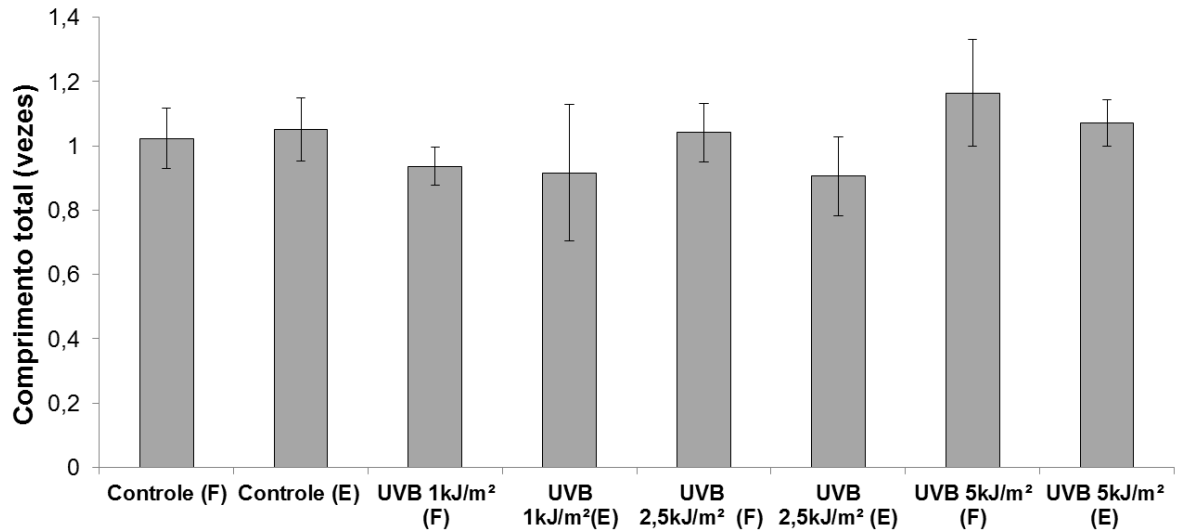
O grupo mantido no escuro (grupo E) e submetido às irradiações crônicas de 1 kJ/m<sup>2</sup> de UVB apresentou redução na sua massa corporal em relação ao seu respectivo grupo controle e ao grupo exposto ao tratamento de fotorreativação (grupo F) ( $F_{3,8} = 6,43$ ;  $p < 0,05$ ).

Entretanto, aqueles irradiados com UVA não apresentaram diferenças significativas na massa corporal durante dos 15 dias de experimento.

#### 4.1.2 Comprimento total

##### a) Tratamento Agudo

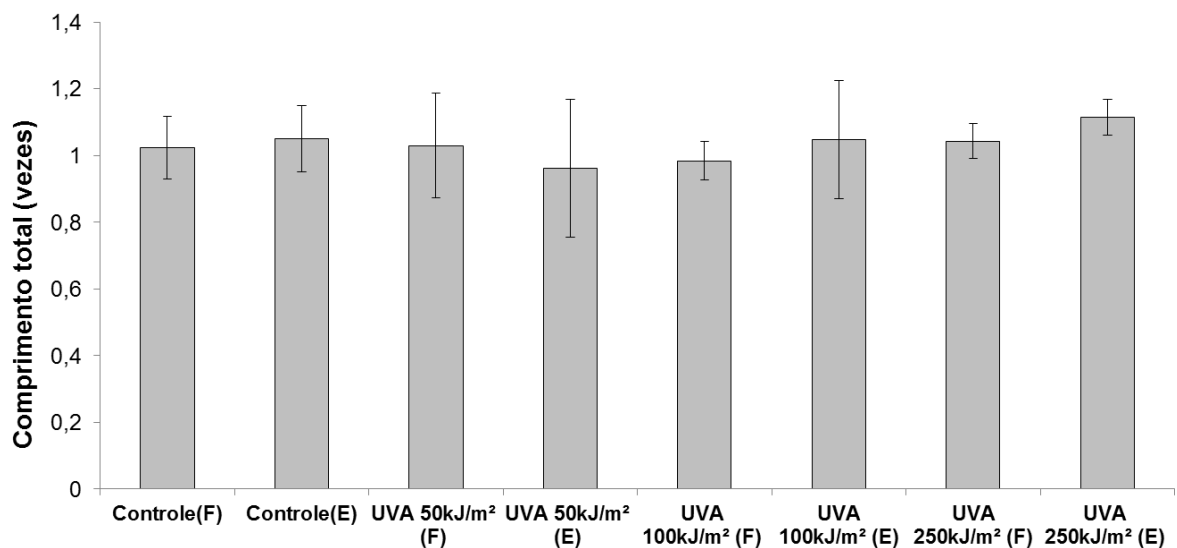
Figura 7 – Comprimento total dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo)



Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Figura 8 – Comprimento total dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo)



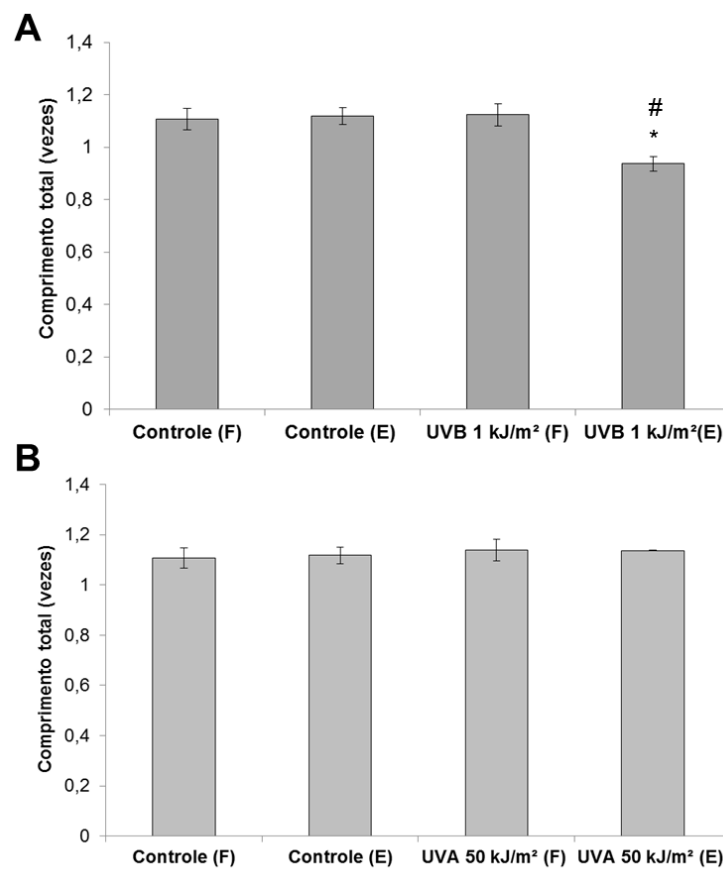
Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Nenhum grupo do tratamento agudo, irradiado com luz UVB ou UVA, apresentou diferença no comprimento total em relação aos controles ou aos seus respectivos tratamentos de fotorreativação.

b) Tratamento Crônico

Figura 9 – Comprimento total dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Crônico)



Fonte: Autora.

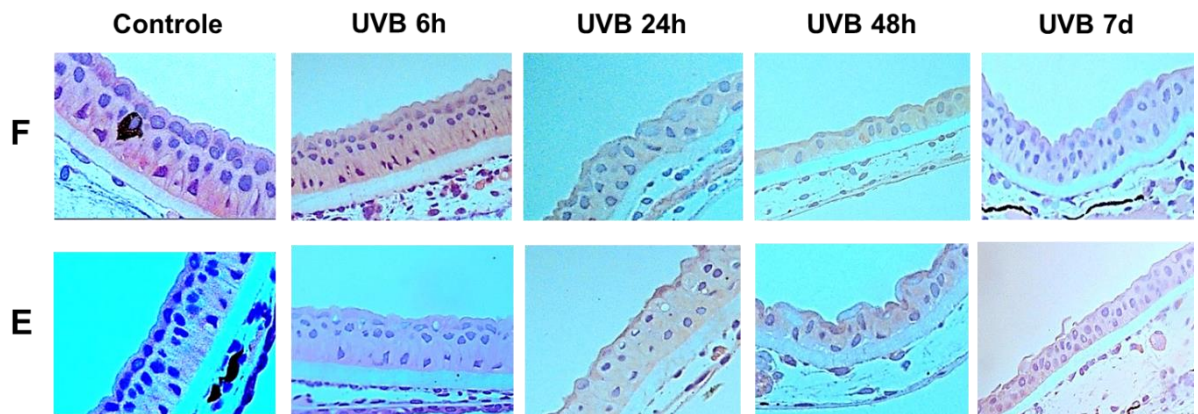
Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos. \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ).

Após as irradiações do Tratamento Crônico, apenas o grupo irradiado com as doses crônicas de 1 kJ/m<sup>2</sup> de UVB que permaneceu no escuro (grupo E) apresentou redução no seu comprimento em relação ao controle e ao seu respectivo grupo exposto ao tratamento de fotorreativação (grupo F) ( $F_{3,8} = 20,0$ ;  $p < 0,05$ ). Nenhum grupo irradiado com as doses crônicas de UVA apresentou diferença significativa no

comprimento total quando comparados aos controles ou tratamentos de fotorreativação.

#### 4.1.3 Histologia da epiderme e análises do aparato bucal

Figura 10 – Imagens representativas da epiderme (estrato córneo e camada de células) dos indivíduos em diferentes tempos de recuperação após as irradiações com UVB

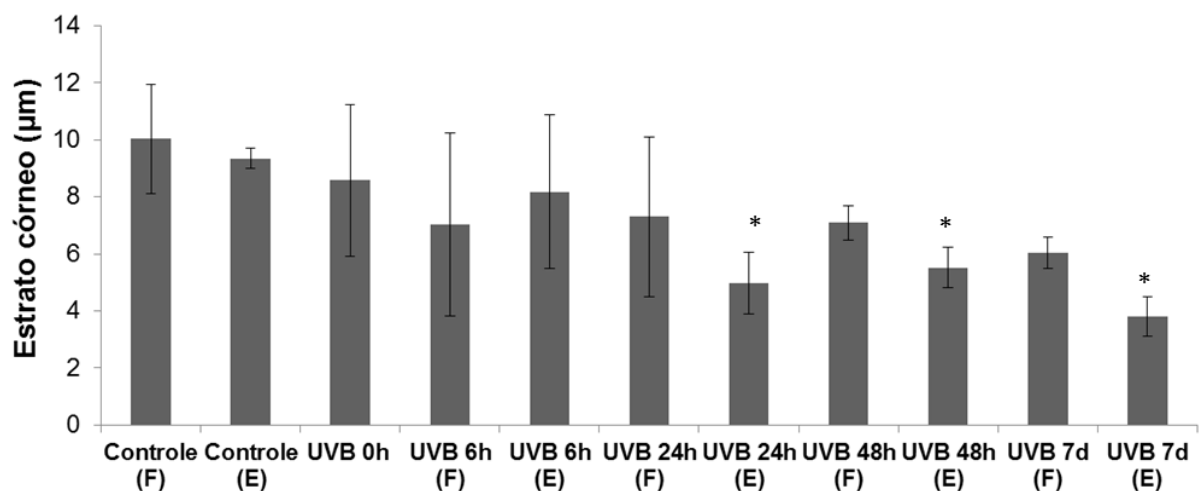


Imagens: Luiza Loebens

Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos indivíduos que foram submetidos à fotorreativação após a irradiação e (E) os indivíduos que permaneceram no escuro até o fim do experimento.

Figura 11 – Espessura do estrato córneo de indivíduos irradiados com UVB

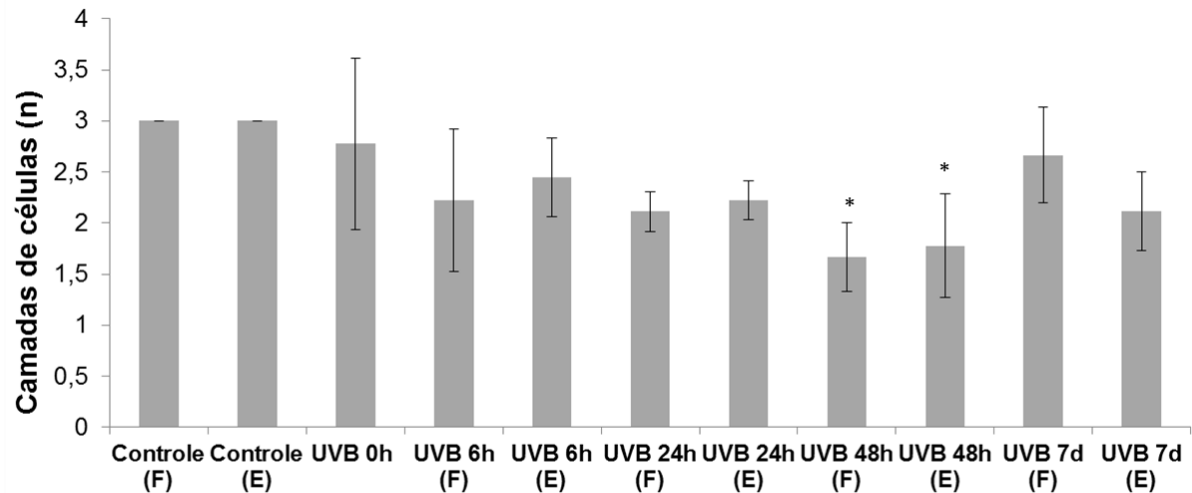


Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

\*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

Figura 12 – Camadas celulares da epiderme de indivíduos irradiados com UVB



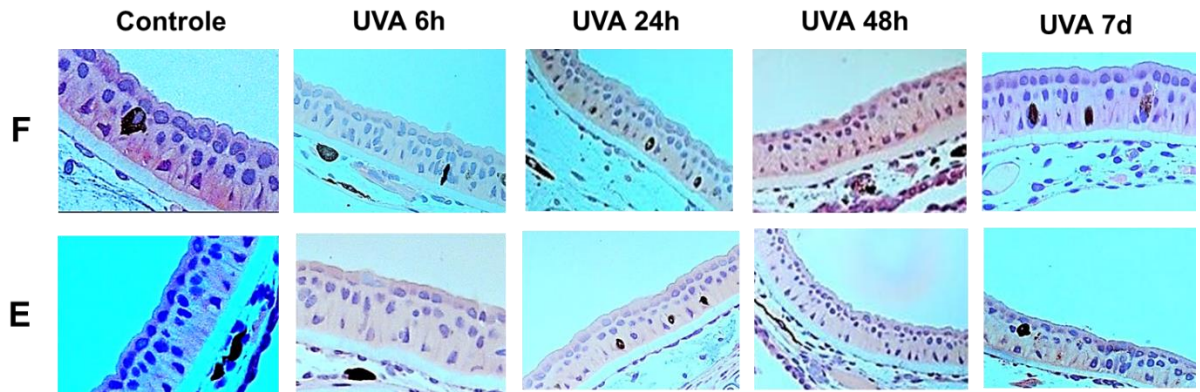
Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos. \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ).

Nas figuras 10 e 11 é possível observar que a espessura do estrato córneo diminui ao longo do tempo, após a irradiação com luz UVB, sendo essa diminuição mais expressiva naqueles indivíduos privados do tratamento de fotorreativação (grupo E). Conseqüentemente, a partir de 24 horas, aqueles girinos que permaneceram no escuro apresentaram redução nessa estrutura quando comparados ao seu controle ( $F_{10,22} = 4,5$ ;  $p < 0,05$ ). Enquanto a média da espessura do estrato córneo no grupo controle E foi de  $9,35 \mu\text{m}$ , os grupos E irradiados com UVB e fixados 24 e 48 horas após a irradiação apresentaram médias de 5 e  $5,5 \mu\text{m}$ , respectivamente. Adicionalmente, sete dias após a irradiação com UVB, a espessura do estrato córneo reduziu para um valor de  $3,8 \mu\text{m}$  (grupo E), 60% menor que seu respectivo controle. Aqueles indivíduos submetidos à fotorreativação nesses mesmos períodos também apresentaram espessuras menores que o controle, mas essa diferença não foi significativa.

Em relação às camadas de células, é possível observar uma redução significativa em relação ao controle 48 horas após as irradiações com UVB, tanto nos indivíduos submetidos à fotorreativação, como nos que permaneceram no escuro ( $F_{10,22} = 3,8$ ;  $p < 0,005$ ).

Figura 13 – Imagens representativas da epiderme (estrato córneo e camada de células) dos indivíduos em diferentes tempos de recuperação após as irradiações com UVA

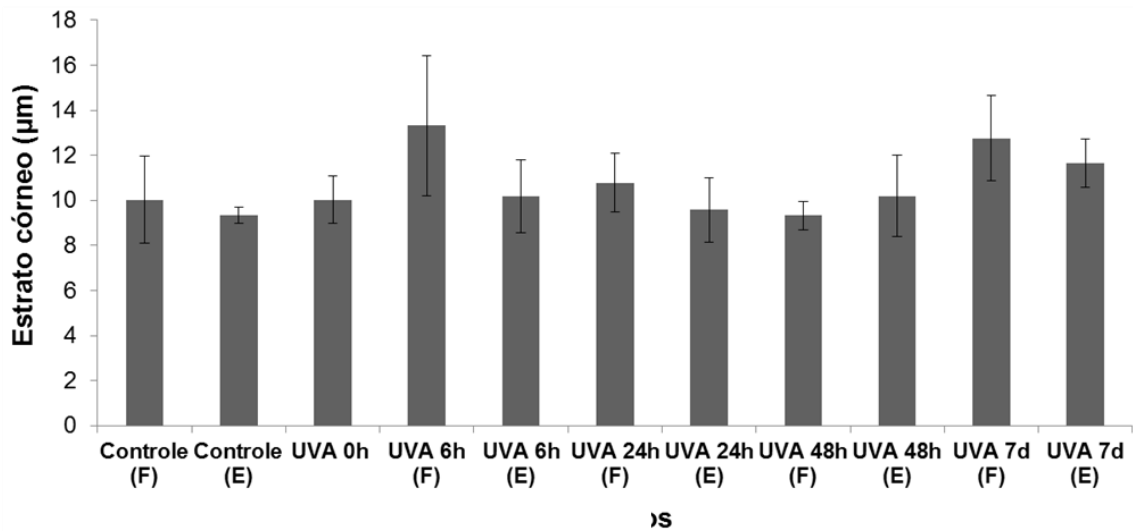


Imagens: Luiza Loebens

Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos indivíduos que foram submetidos à fotorreativação após a irradiação e (E) os indivíduos que permaneceram no escuro até o fim do experimento.

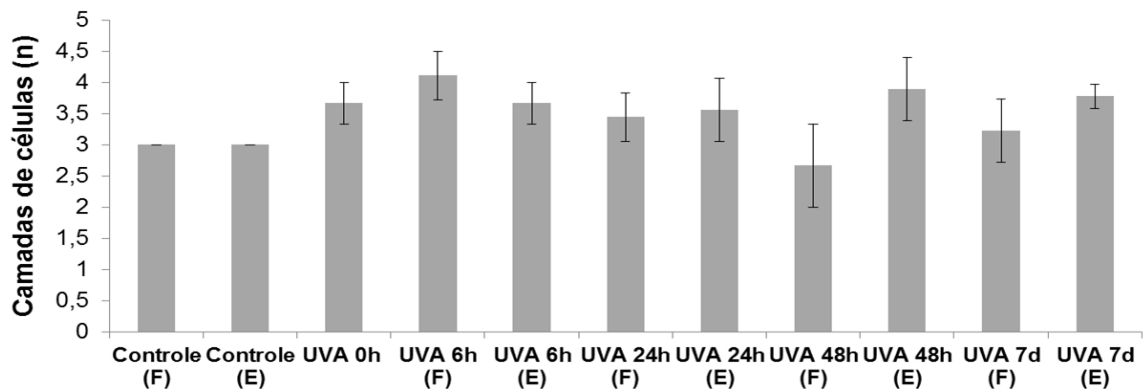
Figura 14 – Espessura do estrato córneo de indivíduos irradiados com UVA



Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Figura 15 – Camadas celulares da epiderme de indivíduos irradiados com UVA

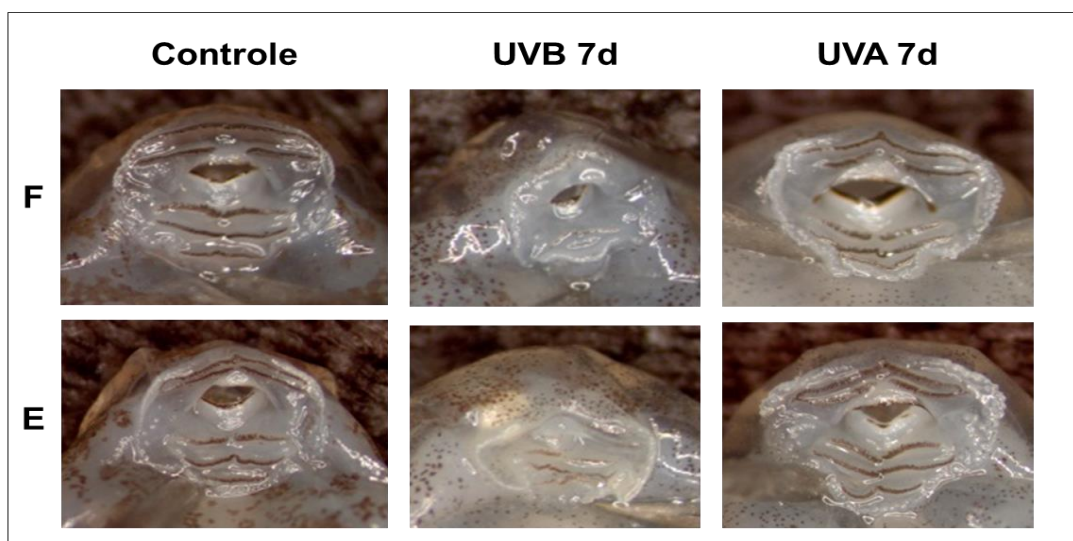


Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Entre os girinos irradiados com luz UVA não houve diferença na espessura do estrato córneo e nas camadas de células quando comparados aos controles não irradiados ou aos seus respectivos grupos expostos aos tratamentos de fotorreativação.

Figura 16 – Imagens representativas do disco oral dos indivíduos irradiados com UVB e UVA



Imagens: Luiza Loebens

Fonte: Autora.

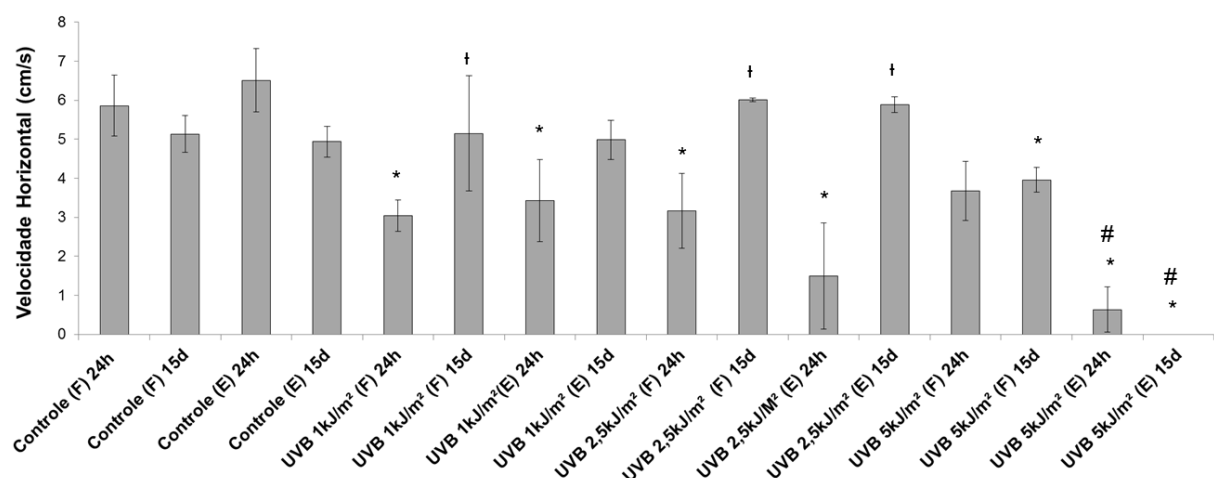
Legenda: (F) corresponde aos indivíduos que foram submetidos à fotorreativação após as irradiações e (E) aos indivíduos que permaneceram no escuro até o fim do experimento. 7d = sete dias após as irradiações.

A partir das imagens do aparato bucal dos girinos é possível visualizar diferenças significativas nas estruturas queratinizadas da boca. Há perda de grande parte dessas estruturas nos girinos irradiados com UVB (F e E) quando comparados aos girinos não irradiados (controles). Os queratodontes são quase ou totalmente ausentes naqueles indivíduos irradiados com 5 kJ/m<sup>2</sup> de UVB, onde tanto as fileiras superiores como as inferiores são destruídas pelos efeitos da luz UVB. O mesmo efeito é observado na mandíbula (superior e inferior), que é visível nos controles e indivíduos irradiados com UVA, entretanto a mesma desaparece naqueles irradiados com luz UVB. É importante ressaltar que essas estruturas, em específico, são formadas por queratina e, portanto, devem ter sofrido ação da UV. Outros girinos expostos aos demais períodos de recuperação (3 horas, 6 horas, 24 horas e 48 horas) também foram fotografados, entretanto os danos nas estruturas queratinizadas não são tão claros como em sete dias após a exposição à UVB, apesar de apresentarem falhas nessas estruturas também.

## 4.2 IMPACTO DOS TRATAMENTOS COM LUZ UVB E UVA NA PERFORMANCE LOCOMOTORA DE GIRINOS DE *H. PULCHELLUS*

### a) Tratamento Agudo

Figura 17 – Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo)



Fonte: Autora.

Legenda: As medidas de velocidade foram realizadas 24 horas após as irradiações e ao 15º dia de experimento. (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos



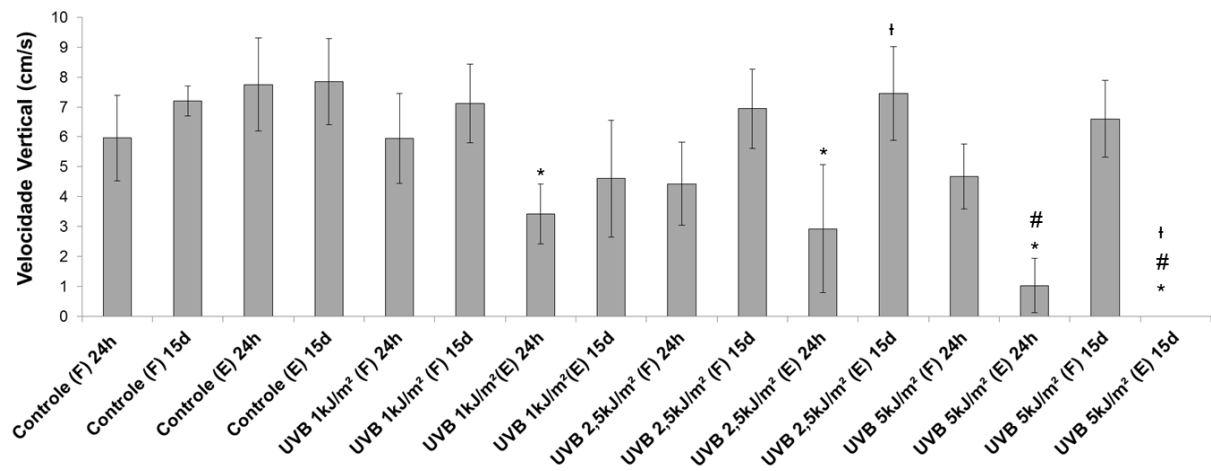
experimentos. \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ); †Significante em relação à velocidade medida 15 dias após o respectivo tratamento ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliarmos os grupos de girinos irradiados com a dose mais baixa de UVB ( $1 \text{ kJ/m}^2$ ), observa-se uma velocidade reduzida, tanto no grupo F como no grupo E, em relação aos respectivos controles 24 horas após as irradiações. E o grupo submetido a fotorreativação apresentou aumento da velocidade 15 dias após a irradiação.

Já os girinos irradiados com a dose intermediária de  $2,5 \text{ kJ/m}^2$  também apresentaram diferença estatística significativa em relação aos respectivos controles, tanto aqueles submetidos à fotorreativação quanto os que permaneceram no escuro. Contudo, apesar de não haver diferença estatística, observa-se claramente que os girinos irradiados e posteriormente mantidos no escuro por 24 horas são mais lentos do que aqueles expostos ao tratamento de fotorreativação. Aqui, também se observa que ambos os grupos F e E apresentaram uma significativa recuperação ao longo do período de 15 dias, também atingindo velocidades semelhantes aos controles.

Os girinos irradiados com a maior dose de UVB ( $5 \text{ kJ/m}^2$ ), mantidos no escuro, também apresentaram menores velocidades 24 horas após a exposição. Em adição, observa-se um efeito severo e significativo da privação do reparo por fotorreativação, 15 dias após a irradiação. O grupo E apresentou uma redução total da velocidade, pois mesmo poucos indivíduos que sobreviveram ao fim do tratamento não eram capazes de se locomover (Velocidade 0). E o grupo F, que também apresentou velocidade menor que seus controles não foi capaz de aumentar sua velocidade horizontal 15 dias após a irradiação ( $F_{15,32} = 12,7$ ;  $p < 0,05$ ).

Figura 18 – Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Agudo)

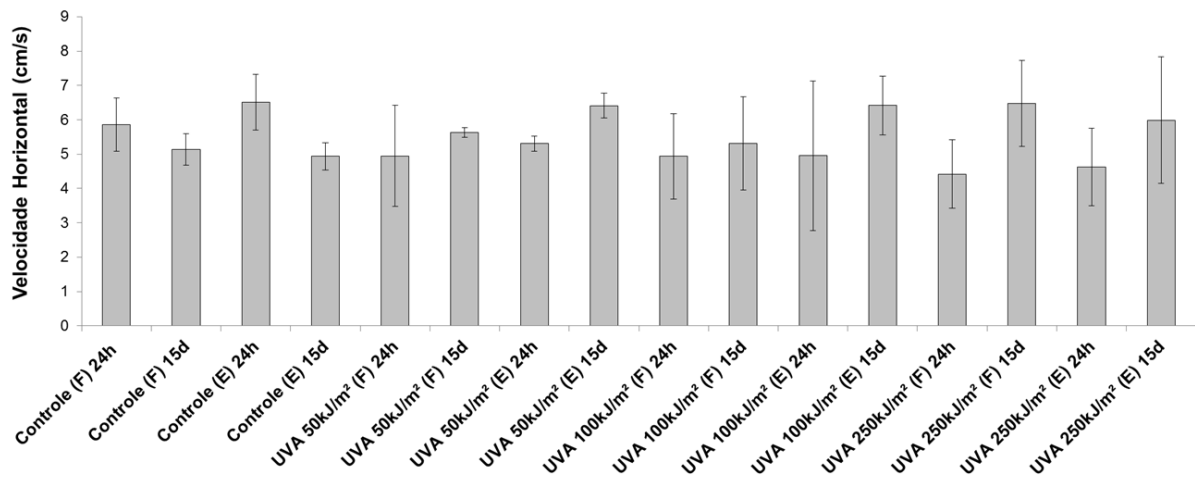


Fonte: Autora.

Legenda: As medidas de velocidade foram realizadas 24 horas após as irradiações e ao 15º dia de experimento (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos. \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ); †Significante em relação à velocidade medida 15 dias após o respectivo tratamento ( $p < 0,05$ ).

Os valores de velocidade vertical apresentaram redução significativa em relação aos controles nos grupos irradiados com UVB, que permaneceram por 24 horas no escuro (1 kJ/m<sup>2</sup> E; 2,5 kJ/m<sup>2</sup> E e 5 kJ/m<sup>2</sup> E) e também o grupo 5 kJ/m<sup>2</sup> E, avaliado 15 dias após as irradiações. Neste resultado também vale destacar que todos os girinos irradiados e posteriormente mantidos no escuro por 24 horas apresentaram velocidade menor do que aqueles expostos ao tratamento de fotorreativação. Também é possível observar que principalmente os grupos F apresentaram um maior aumento (recuperação) da velocidade ao longo de 15 dias de experimento, atingindo velocidades semelhantes aos controles ( $F_{14,30} = 6,6$ ;  $p < 0,05$ ).

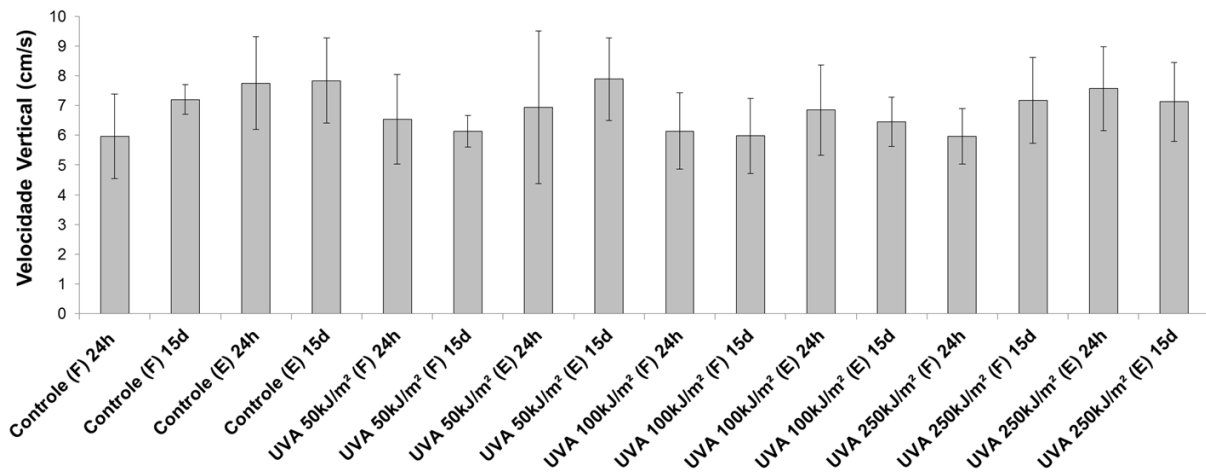
Figura 19 – Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo)



Fonte: Autora.

Legenda: As medidas de velocidade foram realizadas 24 horas após as irradiações e ao 15º dia de experimento. (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Figura 20 – Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Agudo)



Fonte: Autora.

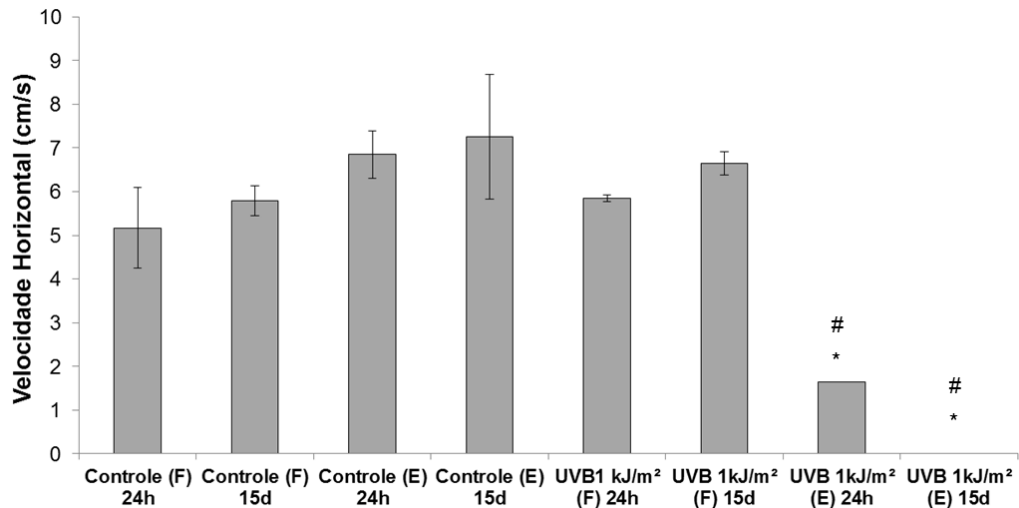
Legenda: As medidas de velocidade foram realizadas 24 horas após as irradiações e ao 15º dia de experimento. (F) corresponde aos grupos submetidos ao tratamento de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Os girinos irradiados com as diferentes doses de radiação UVA não apresentaram diferença nas suas velocidades horizontal e vertical, quando

comparados aos seus respectivos grupos controle, tratamentos de fotorreativação e ao período de 15 dias de recuperação.

b) Tratamento Crônico

Figura 21 – Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Crônico)

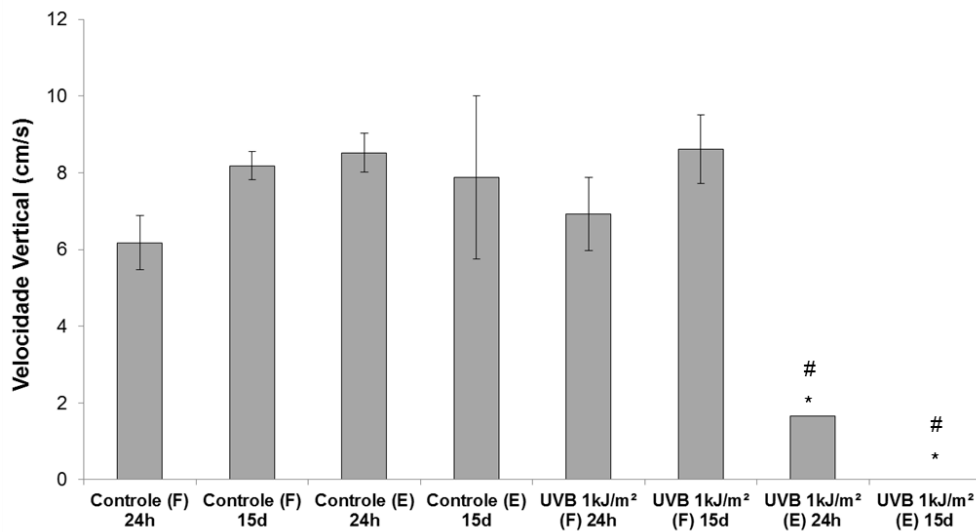


Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos aos tratamentos de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos. \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ).

Neste tratamento, os girinos irradiados com doses crônicas de UVB e mantidos no escuro apresentaram diferença estatística significativa na velocidade horizontal, quando comparados aos girinos expostos ao tratamento de Fotorreativação, 24 horas e 15 dias após a última irradiação. Quando comparados ao controle, os girinos tratados com UVB também apresentaram diferença estatística significativa. ( $F_{7,16} = 23,26$ ;  $p < 0,05$ ).

Figura 22 – Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVB (Tratamento Crônico)

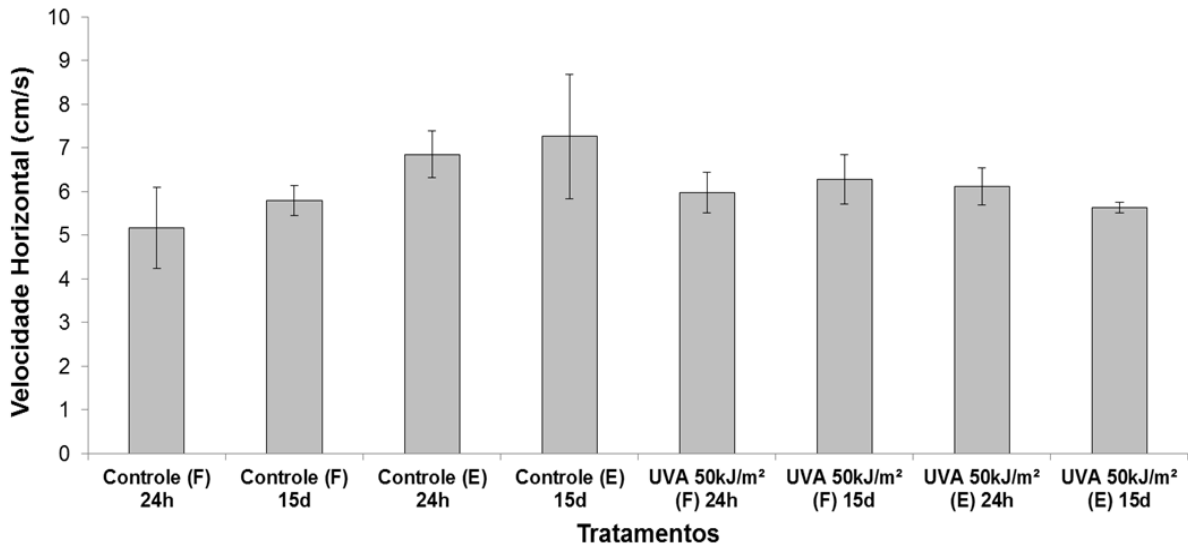


Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos aos tratamentos de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos. \*Significante em relação ao respectivo controle ( $p < 0,05$ ); #Significante em relação ao tratamento de fotorreativação ( $p < 0,05$ ).

A velocidade vertical dos girinos submetidos à luz UVB e privados do tratamento de fotorreativação (grupo E) foi estatisticamente significativa em relação à velocidade dos girinos controle e também dos irradiados com luz UVB e expostos ao tratamento de fotorreativação. Indivíduos submetidos à fotorreativação apresentaram velocidades semelhantes aos controles, entretanto, os indivíduos que permaneceram no escuro, 24 horas após as irradiações, apresentaram velocidade 76% menor que seus respectivos tratamentos de fotorreativação, e permaneceram incapazes de se locomover 15 dias após as irradiações. ( $F_{7,16} = 18,14$ ;  $p < 0,05$ ).

Figura 23 – Velocidade horizontal dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Crônico)

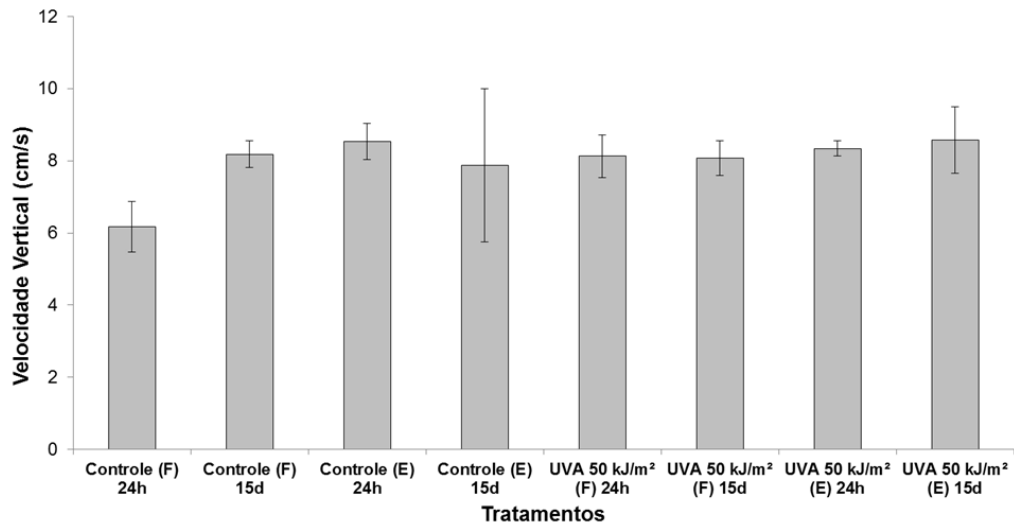


Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos aos tratamentos de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Novamente, os girinos irradiados com doses crônicas de UVA não apresentaram diferença estatística significativa na sua velocidade horizontal, tanto em relação aos seus respectivos controles como com os tratamentos de fotorreativação.

Figura 24 – Velocidade vertical dos indivíduos irradiados com UVA (Tratamento Crônico)



Fonte: Autora.

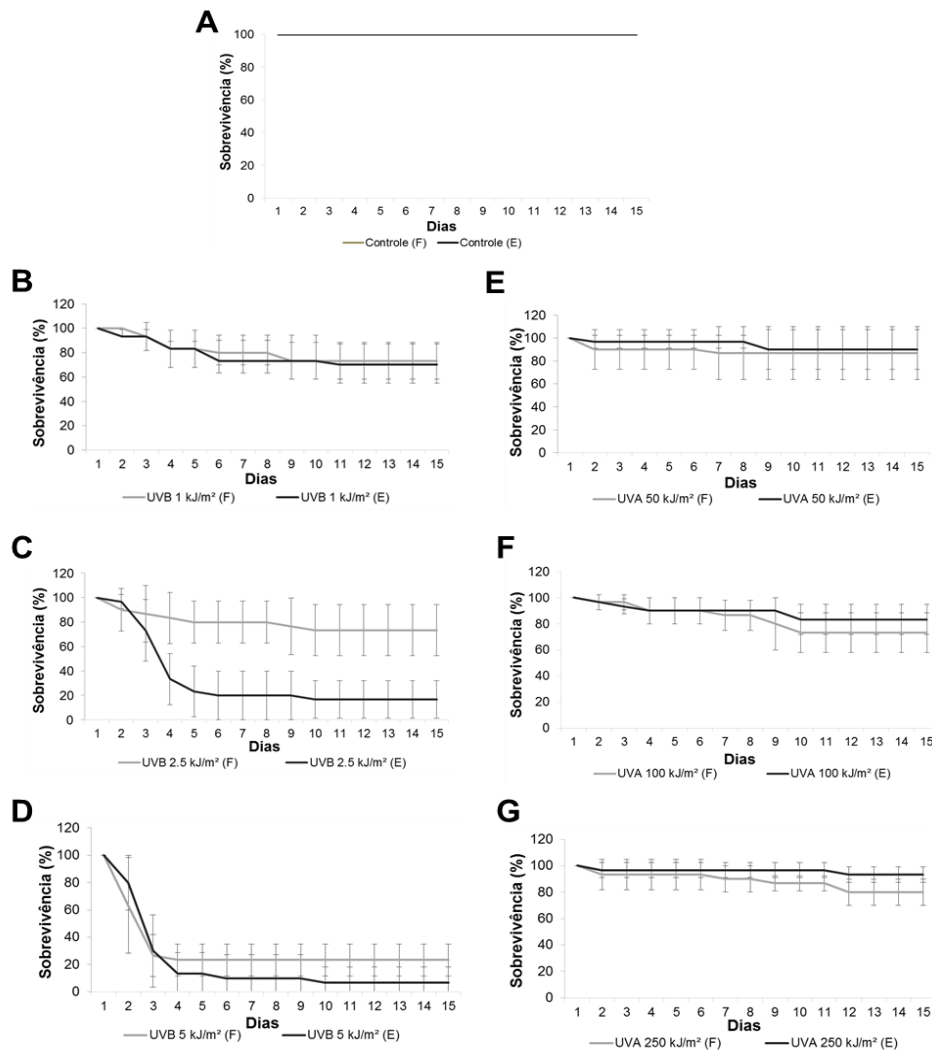
Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos aos tratamentos de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Assim como no Tratamento Agudo, os girinos irradiados com UVA não apresentaram diferença estatística significativa entre as suas velocidades verticais.

#### 4.3 IMPACTO DOS TRATAMENTOS COM LUZ UVB E UVA NA SOBREVIVÊNCIA DE GIRINOS DE *H. PULCHELLUS*.

##### a) Tratamento Agudo

Figura 25 – Sobrevivência dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (tratamento Agudo)



Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos aos tratamentos de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

Como podemos visualizar na Figura 25 (A), os indivíduos controles, sem influência dos efeitos da radiação UVB e UVA, tiveram uma sobrevivência de 100% ao fim do experimento. Entretanto, a exposição dos girinos à dose mais baixa de UVB (1 kJ/m<sup>2</sup>) reduziu a sobrevivência em 20%, tanto daqueles submetidos a fotorreativação como dos que permaneceram no escuro.

Entretanto, após a exposição à dose intermediária de UVB (2,5 kJ/m<sup>2</sup>) é evidente o efeito da fotorreativação no reparo dos danos provocados. Os indivíduos submetidos a esse tratamento de fotorreativação apresentaram uma sobrevivência de 80%, enquanto os indivíduos que não foram submetidos a fotorreativação apresentaram uma sobrevivência de 20%.

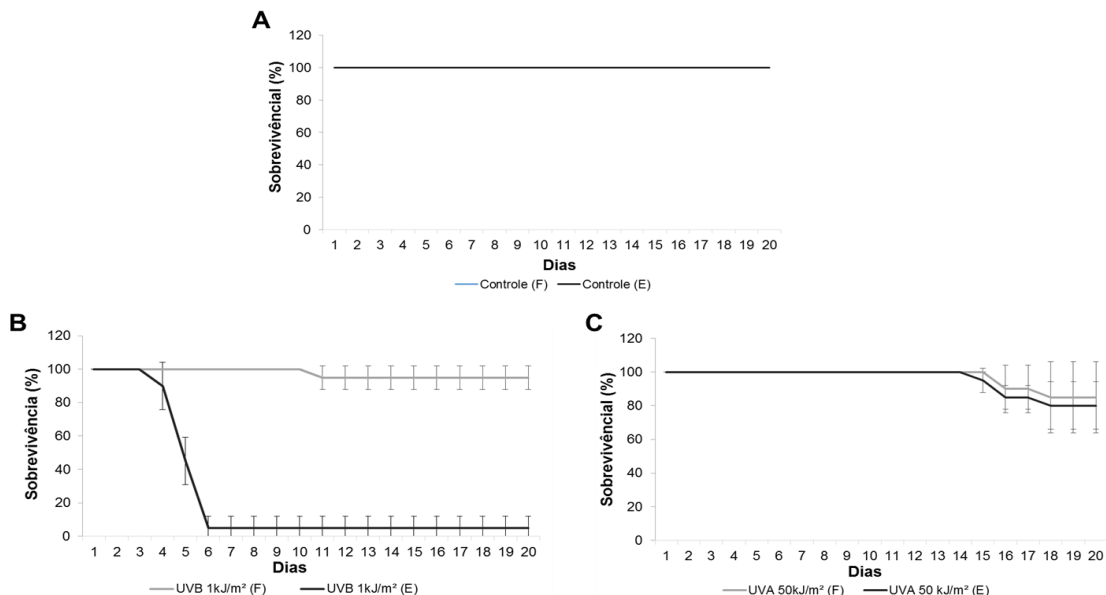


As exposições dos girinos à dose mais alta de UVB (5 kJ/m<sup>2</sup>) reduziram severamente os valores de sobrevivência em ambos os grupos (F e E). Aqueles indivíduos submetidos à fotorreativação apresentaram uma sobrevivência média de 30%, enquanto aqueles mantidos no escuro apresentaram média de 20%.

Por outro lado, os girinos submetidos às irradiações com luz UVA apresentaram uma alta redução na sobrevivência, entretanto sem diferença entre os grupos E e F.

## b) Tratamento Crônico

Figura 26 – Sobrevivência dos indivíduos irradiados com UVB e UVA (Tratamento Crônico)



Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos grupos submetidos aos tratamentos de fotorreativação imediatamente após as irradiações e (E) aos grupos que permaneceram no escuro até o fim dos experimentos.

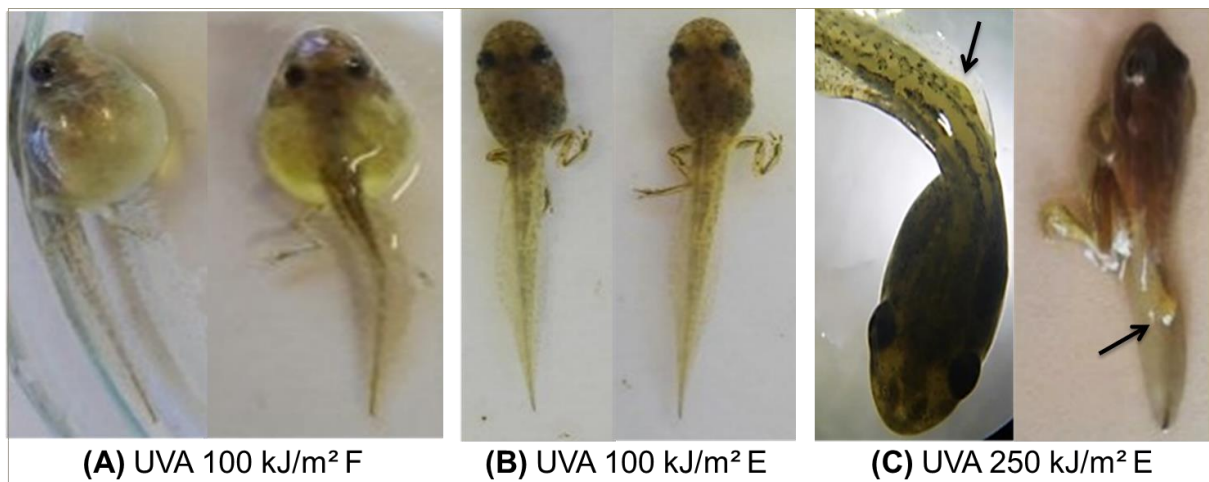
A Figura 26.B mostra os efeitos cumulativos da radiação UVB, mesmo que em doses baixas, como 1 kJ/m<sup>2</sup>, a qual resultou em alta mortalidade. Adicionalmente, esse dado mostra que os girinos dessa espécie são extremamente dependentes das enzimas fotoliasas para a sua sobrevivência em um ambiente de exposição à luz UVB. Ao contrário, a Figura 26.C mostra que esse mesmo impacto letal não é observado após as irradiações crônicas com a dose de UVA, pois os

girinos submetidos à fotorreativação tiveram uma redução na sobrevivência semelhante aqueles mantidos no escuro.

#### 4.4 MALFORMAÇÕES

Na figura 27 são apresentados exemplos de malformações observadas em girinos irradiados com UVA em diferentes doses de irradiação.

Figura 27 – Imagens representativas de girinos com malformações irradiados com UVA



Fonte: Autora.

Legenda: (F) corresponde aos indivíduos que foram submetidos à Fotorreativação após as irradiações e (E) aos indivíduos que permaneceram no escuro até o fim do experimento. 7d = sete dias após as irradiações.

Alguns indivíduos irradiados com luz UVA apresentaram malformações durante e após os experimentos de tratamento Agudo. Como é possível visualizar na Figura 27, as malformações ocorreram em girinos submetidos às doses mais altas de UVA. Girinos que apresentaram edema de tegumento, como representado na Figura 27.A, invariavelmente morreram logo após o fim dos experimentos. Alguns indivíduos apresentaram sérias deformidades nas patas traseiras, como exemplificado na Figura 27.B, e por isso permaneceram impossibilitados de se locomover quando sobreviviam após a metamorfose, logo, não foram capazes de se alimentar e também morreram poucos dias depois. Na figura 27.C é demonstrado

um possível tumor na cauda do girino, que permaneceu até a metamorfose. Esse efeito foi observado somente nesse único girino.

## 5 DISCUSSÃO

A partir de estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa (SCHUCH, 2015a), foi demonstrado que o aumento da incidência de radiação UV solar, devido à destruição do ozônio estratosférico, pode ajudar a explicar o declínio enigmático de populações de anfíbios em localidades específicas. Também, de acordo com KIESECKER (2001), as mudanças climáticas podem agir sinergicamente com a destruição do ozônio e aumentar ainda mais a exposição aos nocivos raios UVB. Com isso, uma série complexa de interações que envolvem tanto mudanças nos fatores físicos (profundidade da água e exposição aos raios UVB) como bióticos (surtos de doenças) podem alterar padrões de mortalidade dos anfíbios. Além disso, devido a grande importância dos mecanismos de reparo de DNA, é provável que a diferença de sensibilidade aos efeitos da radiação solar e a diferente capacidade de reparo desses danos entre as espécies possa contribuir para o declínio populacional de anfíbios (BLAUSTEIN, 1994).

De forma complementar a esses trabalhos, os resultados apresentados aqui, de uma maneira geral, demonstram a grande importância do mecanismo de reparo por fotorreativação na performance dos girinos de *Hypsiboas pulchellus*. Pois, girinos submetidos à fotorreativação são capazes de reverter lesões no DNA, por meio da ativação das enzimas fotoliase, e de recuperar sua atividade normal, com valores semelhantes aos dos controles. Adicionalmente, demonstramos que a radiação UV solar causa sérios efeitos na morfologia e na sobrevivência, além de comprometer a atividade locomotora dos girinos, principalmente quando expostos à UVB.

Como já demonstrado, a exposição à UVB afeta a sobrevivência dos girinos (BRIDGES; BOONE, 2003; ALTON, 2012). Nossos dados mostram que, durante um curto período de tempo, a luz UVB é capaz de induzir efeitos subletais no seu desenvolvimento e, em maiores doses é, de fato, letal para esses indivíduos. Adicionalmente, o mecanismo de reparo por fotorreativação mostrou-se essencial para reparar lesões de DNA gerados pela luz UVB, principalmente após exposições a doses muito baixas, como também observado por SCHUCH (2015a). Entretanto, os resultados aqui apresentados mostram que somente esse mecanismo de reparo

não é suficiente para remover todos os danos causados por diferentes incidências desse comprimento de onda. Desta forma, ao considerarmos que a dose mais alta utilizada em nossos experimentos correspondeu a 10% da incidência diária de radiação solar na natureza, e indivíduos submetidos a essa exposição sofreram altíssima mortalidade, é de extrema importância que os animais tenham outros mecanismos para sua defesa contra os efeitos letais dos raios UVB.

Algumas estruturas corporais dos girinos são essenciais para a sua sobrevivência e, quando danificadas, podem impossibilitar atividades corriqueiras de alimentação e respiração. A maioria dos girinos desenvolvem pulmões funcionais bem antes da metamorfose e, portanto, usam suas bocas para essas duas funções. Por isso, a respiração e a alimentação são limitadas pelo fato de que a boca deve ser capaz de capturar os alimentos e o ar durante a maior parte do período larval. Conseqüentemente, alterações no aparato bucal podem desencadear, diretamente, variações no peso corporal ou limitar a atividade respiratória dos girinos, visto que estes precisam lidar eficientemente com os dois fluidos, o ar e a água (WASSERSUG, 2001).

Além disso, como observado por TOLLEDO (2014), girinos com anomalias labiais, ao serem comparados a indivíduos normais, gastam menos tempo e têm uma menor eficiência de forrageamento. Dessa maneira, sua capacidade alimentar é reduzida, podendo resultar em uma menor taxa de crescimento, maior tempo gasto para a conclusão da metamorfose, maior risco de predação, diferente massa corporal, tamanho e morfologia em fase metamórfica e adulta (BRIDGES; BOONE, 2003; CRUMP, 2000; SCHUCH, 2015a). Dessa forma, a redução na massa corporal dos girinos provavelmente está diretamente relacionada às alterações no aparato bucal dos indivíduos irradiados. Além disso, há uma importante relação entre as deformidades no aparato bucal e o tipo de alimento selecionado pelos girinos, logo, girinos com anomalias labiais podem apresentar diferente capacidade de alimentação, que também pode alterar sua taxa de crescimento (ROWE, 1996).

Os resultados morfológicos desse estudo demonstram que a radiação UV solar tem importante efeito na redução da massa corporal dos indivíduos, pois girinos submetidos à radiação UVB e UVA apresentaram redução no seu peso quando comparados aos controles, além de apresentar redução significativa nos grupos mantidos no escuro quando comparados aos tratamentos de fotorreativação, o que demonstra o efeito desse mecanismo na recuperação da massa corporal

desses indivíduos. Portanto, ao analisarmos o aparato bucal dos girinos submetidos às doses mais altas de UVB e UVA, é possível demonstrar que o impacto degenerativo da luz UVB é extremamente danoso nas estruturas queratinizadas, como a mandíbula e as fileiras de queratodontes. Conseqüentemente, isto causa um efeito importante na redução da performance desses animais, pois impede atividades fundamentais para sua sobrevivência, como alimentação e desenvolvimento.

Adicionalmente, a sobrevivência dos anuros está estreitamente relacionada à disponibilidade de água, pois estes animais são especialmente dependentes de água e/ou da humidade atmosférica para sua reprodução, principalmente por serem vulneráveis à desidratação, ao menos em uma fase de suas vidas (ovo, girino ou pós-metamórficas) (PRADO, 2005). Uma das principais estruturas de defesa contra a desidratação e proteção a agentes externos é a pele e, por isso, compreender a ação de efeitos danosos a essa estrutura é de extrema importância para a sobrevivência desses indivíduos.

Como demonstrado por FORMICKI (2003), quando submetidos a radiação UVB, os girinos podem aumentar seu consumo de oxigênio durante a respiração, o que ocorre pelo aumento da sua taxa metabólica, provavelmente devido a maior atividade interna do organismo no reparo das lesões causadas pela UV. Além da respiração cutânea, os girinos utilizam as brânquias para realizar suas trocas gasosas, então, para que haja a difusão de gases, assim como qualquer superfície respiratória, é necessário que a pele esteja umedecida. De forma que alterações nessa estrutura podem desencadear dificuldades na realização de atividades normais ao organismo e comprometer seu desempenho. Devido a maior eliminação de dióxido de carbono ser realizada pela pele, essa estrutura apresenta alta importância para a respiração desses animais (NAPOLI, 1995).

Pela primeira vez, nossos dados indicam que a radiação UVB induz grandes alterações na conformidade e estruturação da epiderme de girinos irradiados. Essas alterações se devem principalmente ao efeito da luz UVB no estrato córneo, o qual se torna mais quebradiço, deixando as camadas de células internas mais expostas ao meio externo. Os dados aqui mostrados indicam que há uma redução nas camadas celulares 48 horas após as irradiações, o que possivelmente se deve as lesões de DNA causadas pela radiação UV, que podem desencadear processos de morte celular e comprometer a produção de novas células. Como conseqüências

desse impacto, além de prováveis alterações na respiração, lesões e feridas na pele podem ser mais facilmente infectadas por parasitas, aumentando assim ainda mais a mortalidade desses indivíduos (FLAMARIQUE, 2000).

Como vem sendo explorado por outros autores ao longo dos anos, a morfologia parece ter uma forte ligação com a velocidade de nado dos girinos (WASSERSUG, 1985; WASSERSUG, 1989, LIU, 1996; WASSERSUG, 2000) e também está relacionada com a eficiência no deslocamento e, principalmente, com a fuga de predadores (ALTON, 2012). Ao avaliarmos o comprimento total dos girinos não houve influência significativa do efeito da radiação solar no Tratamento Agudo, possivelmente pelo experimento ser concluído no período de apenas 15 dias. Entretanto, no Tratamento Crônico, houve redução significativa no comprimento do corpo do grupo irradiado com UVB, mantido no escuro, menor que seu respectivo controle, assim como em relação ao tratamento de fotorreativação. Como demonstrado por WATKINS (1997), a velocidade máxima de explosão dos girinos pode ser positivamente correlacionada com a mudança no comprimento da cauda e comprimento total. Porém, tentamos relacionar a interação entre os efeitos morfológicos e locomotores que foram desencadeados por danos e alterações comportamentais resultantes da exposição dos girinos a luz UV solar. Entretanto, apesar de demonstrarmos que os efeitos da UVB são extremamente importantes na alteração de características morfológicas e também da capacidade locomotora, é necessário que haja maior investigação entre suas relações diretas.

Nossos experimentos locomotores demonstram que a radiação UVB é capaz de promover alterações na capacidade locomotora dos girinos, pois altera seu comportamento e impossibilita o deslocamento na coluna d'água. A velocidade horizontal corresponde à capacidade de fuga e impulso, por isso é extremamente importante para sua sobrevivência a predação, por exemplo. A ação da radiação UV solar pode comprometer a atividade de fuga e promover um maior custo energético para esses indivíduos que, quando expostos a outros agentes estressores, tornam-se ainda mais vulneráveis (ALTON, 2012). Indivíduos submetidos às doses mais altas de UVB apresentaram atividade natatória completamente diferente dos controles, pois estão aparentemente muito debilitados e praticamente incapazes de se locomover.

De fato, demonstramos que a atividade das enzimas fotoliasas mostrou-se ser fundamental para a manutenção da locomoção desses indivíduos, principalmente

nas doses mais baixas de UVB. Uma única exposição a 1 kJ/m<sup>2</sup> (Tratamento Agudo) parece ter menor efeito sobre os girinos e sua velocidade horizontal é capaz de retornar a valores semelhantes ao controle quando submetidos a fotorreativação. Aqueles que permaneceram no escuro também são capazes de reparar seus danos, certamente por outros mecanismos de reparo. Entretanto, ao serem submetidos a irradiações crônicas da mesma dose (Tratamento Crônico), sem o mecanismo de fotorreativação (E), os indivíduos sofrem sérias consequências locomotoras e, como observado nos resultados de sobrevivência, atingem 100% de mortalidade logo após as irradiações.

O efeito da irradiação com a dose intermediária de UVB (2,5 kJ/m<sup>2</sup>) também demonstra a eficiência desse mecanismo, pois, quando submetidos à fotorreativação, os girinos são capazes de retomarem suas velocidades e atingem valores semelhantes ao controle. Porém, indivíduos mantidos no escuro apresentaram menores valores de velocidade horizontal. A dose mais alta de UVB (5 kJ/m<sup>2</sup>) causa danos incapazes de serem reparados pelo mecanismo de fotorreativação, pois girinos submetidos a esse tratamento apresentam velocidade horizontal inferior ao controle e, aqueles que permaneceram no escuro, assim como aqueles irradiados com a dose intermediária (2,5 kJ/m<sup>2</sup>), são incapazes de se locomover e apresentam alta mortalidade.

Os experimentos de velocidade vertical são importantes para compreendermos os efeitos da radiação UV solar, principalmente no comportamento de espécies que ocupam maiores profundidades na coluna d'água, como é o caso de *Hypsiboas pulchellus*. Por meio desses resultados podemos demonstrar que indivíduos submetidos à dose mais alta no Tratamento Agudo e a repetidas doses diárias de 1 kJ/m<sup>2</sup> de luz UVB tornam-se incapazes de afundar, permanecendo na superfície da água. Esse fato aqui observado pode potencializar a ação de outros agressores na natureza, pois, devido à alta suscetibilidade desses indivíduos, os mesmos tornam-se alvos fáceis para predadores, além de estarem mais expostos a temperaturas extremas, agrotóxicos, patógenos e atividade antrópica.

Portanto, nossos dados sugerem que a manutenção da velocidade dos girinos após exposição à radiação UV solar não deve ser diretamente dependente dos seus efeitos na massa e comprimento, mas sim dos danos no DNA e nas estruturas de queratina da pele e da boca que este agente ambiental provoca. Isto se justifica, pois durante a exposição à luz UVA, além da formação de danos no DNA, ocorre,

concomitantemente, a ativação das enzimas fotoliasas e o reparo simultâneo dos danos formados; fenômeno no qual não ocorre quando os girinos são expostos apenas à luz UVB (SCHUCH, 2015b).

Apesar da capacidade locomotora e estruturas queratinizadas permanecerem semelhantes aos controles, indivíduos irradiados com UVA apresentaram sérias malformações, demonstrando que esse comprimento de onda também é capaz de causar danos no DNA e comprometer o desenvolvimento em longo prazo desses organismos. Já a alta eficiência de formação de lesões de DNA pela radiação UVB compromete tanto o comportamento como a performance desses organismos, além de causar alta mortalidade em curto prazo.

## 6 CONCLUSÃO

A espécie *Hypsiboas pulchellus* apresenta alta sensibilidade à radiação solar. Sua sobrevivência é extremamente reduzida, podendo chegar a zero quando submetida a 10% da incidência diária de radiação UVB na natureza. O mecanismo de fotorreativação é extremamente eficiente em baixas doses de UVB, entretanto, não é capaz de reparar os danos de DNA em doses mais altas. Características morfológicas como a massa corporal dos girinos sofre redução quando estes são submetidos à radiação ultravioleta, tanto à luz UVB como UVA. Entretanto, o comprimento total não sofre influência desse agente genotóxico durante o período de 15 dias de experimento. As estruturas queratinizadas da boca e da pele dos girinos sofrem severas alterações pelos efeitos danosos da radiação UVB, comprometendo regiões extremamente importantes para o desenvolvimento e para a sobrevivência desses animais, os quais conseqüentemente passam a ter sua performance reduzida. A capacidade locomotora, medida por velocidades de deslocamento horizontal e vertical dos girinos, também é fortemente reduzida quando submetidos à radiação UVB, impossibilitando a locomoção normal desses indivíduos. Apesar da radiação UVA não ter influenciado a sua locomoção, a massa corporal foi significativamente reduzida e muitos indivíduos apresentaram malformações ao longo deste trabalho, fatores que também comprometem o desenvolvimento saudável desses organismos.



## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, M. G.; KACOLIRIS, F.; DEMETRIO, P.; NATALE, G. S.; BONETTO, C.; RONCO, A. E. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Diseases of aquatic organisms** v. 104, n. 2, p 163, 2013.

ALFORD, R. A. Ecology: Bleak future for amphibians. **Nature: Internacional weekly journal of science**, v. 480, p. 461-462, 2011.

ALTON, L. A.; WILSON, R. S.; FRANKLIN, C. E. A small increase in UV-B increases the susceptibility of tadpoles to predation. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, p. 2575-2583, 2011.

ALTON, L. A.; WHITE, C. R.; WILSON, R. S.; FRANKLIN, C. E. The energetic cost of exposure to UV radiation for tadpoles is greater when they live with predators. **Functional Ecology**, v. 26, n. 1, p. 94-103, 2012.

BANCROFT, B. A.; BAKER, N. J.; BLAUSTEIN, A. R. A Meta-Analysis of the Effects of Ultraviolet B Radiation and Its Synergistic Interactions with pH, Contaminants, and Disease on Amphibian Survival. **Conservation Biology**, v. 22, p. 987-996, 2008.

BECKER, C. G.; FONSECA, C. R.; HADDAD, C. F. B.; BATISTA, R. F.; PRADO, P. I. Habitat split and the global decline of amphibians. **Science**, v. 318, p. 1775-1777, 2007.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: **Declines and disappearances of Australian frogs**, Environment Australia: Canberra, p. 23-33, 1999.

BLAUSTEIN, A. R.; BELDEN, L. K. Amphibian defenses against ultraviolet-B radiation. **Evolution & development**, v. 5, n. 1, p. 89-97, 2003.

BLAUSTEIN, A. R.; HOFFMAN, P. D.; HOKIT, D. G.; KIESECKER, J. M.; WALLS, S.C.; HAYS, J. B. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: a link to population declines? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 1791-1795, 1993.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B.; SOUSA, W. P. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, p. 60-71, 1994.

BOTH, C.; MELO, A. S.; CECHIN, S. Z.; Hartz, S. M. Tadpole co-occurrence in ponds: When do guilds and time matter?. **Acta oecologica**, 37(2), 140-145, 2011..

BRIDGES, C. M.; BOONE, M. D. The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival, growth and development. **Biological Conservation**, v. 113, n. 1, p. 49-54, 2003.

BRÜHL, C. A.; SCHIMIDT, T.; PIEPER, S.; ALSCHER, A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas Histológicas. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV. Instituto Osvaldo Cruz, v. 2, p.89-188, 2010.

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and distributions**, v. 9, p. 89-98, 2003.

CRUMP, D.; BERRILL, M.; COULSON, D.; LEAN, D.; MCGILIVRAY, L.; SMITH, A. Sensitivity of amphibian embryos, tadpoles, and larvae to enhanced UV-B radiation in natural pond conditions. **Canadian Journal of Zoology**, v. 77, p. 1956-1966, 2000.

PRADO, C. P. de A.; UETANABARO, M.; HADDAD, Celio FB. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, n. 2, p. 211-221, 2005.

DRAKE, D. L., ALTIG, R., GRACE, J. B., & WALLS, S. C. Occurrence of oral deformities in larval anurans. **Copeia**, v. 2007, n. 2, p. 449-458, 2007.

DULBECCO, R. Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage by visible light. **Nature**, v. 163, n. 4155, p. 949-950, 1949.

ETEROVICK, P. C.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; BORGES-NOJOSA; SILVANO D. M.; SEGALLA, M. V.; SAZIMA, I. Amphibian Declines in Brazil: An Overview. **Biotropica**, v. 37, p. 166-179, 2005.

FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G.; SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. 1985.

FLAMARIQUE, I. N.; OVASKA, K.; DAVIS, T. M. UV-B induced damage to the skin and ocular system of amphibians. **The Biological Bulletin**, v. 199, p. 187-188, 2000.

FORMICKI, G.; ZAMACHOWSKI, W.; STAWARZ, R. Effects of UV-A and UV-B on oxygen consumption in common toad (*Bufo bufo*) tadpoles. **Journal of Zoology**, v. 259, n. 03, p. 317-326, 2003.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, p. 119-131, 2006.

GONÇALVES, D. S. Diversidade e chave de identificação para girinos ocorrentes em áreas de floresta com Araucária. Dissertação (Mestrado em Zoologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GOSNER, Kenneth L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960.

HOULAHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; SCHMIDT, B. R.; MEYER, A. H.; KUZMIN, S. L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, p. 752-755, 2000.

JOHNSON, P. T.; LUNDE, K. B.; RITCHIE, E. G.; REASER, J. K.; LAUNER, A. E. Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. **Herpetologica**, v. 57, p. 336-352, 2001.

KELNER, A. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. **Journal of bacteriology**, v. 58, n. 4, p. 511, 1949.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R.; BELDEN, L. K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, p. 681-684, 2001.

KOLENC, F.; BORTEIRO, C.; ALCALDE, L.; BALDO, D.; CARDOZO, D.; FAIVOVICH, J. Comparative larval morphology of eight species of *Hypsiboas* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from Argentina and Uruguay, with a review of the larvae of this genus. **Zootaxa**, n. 1927, p 1, 2008.

LAJMANOVÍCH, R. C., PELTZER, P. P., ATTADEMO, A. M., CABAGNA, M. C., JUNGES, C. M.; BASSO, A. Amphibia, Anura, Hylidae, *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Williams and Bosso, 1994): first record and some hematological data in Santa Fe Province, Argentina. **Check List**, v. 8, n 4, p 790-791, 2012.

LIPS, K. R.; BREM, F.; BRENES, R.; REEVE, J. V.; CAREY, C.; LIVO, L.; PESSIER, A. P.; COLLINS, J. P. Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, p. 3165-3170, 2006.

LIU, H.; WASSERSUG, R.; KAWACHI, K. A computational fluid dynamics study of tadpole swimming. **The Journal of experimental biology**, v. 199, n. 6, p. 1245-1260, 1996.

MACIAS, G.; MARCO, A.; BLAUSTEIN, A. R. Combined exposure to ambient UVB radiation and nitrite negatively affects survival of amphibian early life stages. **Science of the Total Environment**, v. 385, n. 1, p. 55-65, 2007.

MOREIRA, L. F. B., MACHADO, I. F., LACE, A. R. G. M.; MALTCHIK, L. Anuran amphibians dynamics in an intermittent pond in Southern Brazil. **Acta Limnol. Brasil**, v. 20, p. 205-212, 2008.

NAGL, Alexander M.; HOFER, Rudolf. Effects of ultraviolet radiation on early larval stages of the Alpine newt, *Triturus alpestris*, under natural and laboratory conditions. **Oecologia**, v. 110, n. 4, p. 514-519, 1997.

NAPOLI, M. F. **Introdução ao estudo dos cordados**, 1995

NHAVENE, E. P. F. Estudo do gene da fotoliase de tripanossomatídeos: expressão heteróloga do gene de *Trypanosoma brucei* EM *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Genética) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

- ROWE, C. Kinney, O., Fiori, A., Congdon, J. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. **Freshwater Biology**, v. 36, n. 3, p. 723-730.
- ROY, D. Amphibians as environmental sentinels. **Journal of Biosciences**, v. 27, p. 187-188, 2002.
- SCHUCH, A. P.; LIPINSKI, V. M.; SANTOS, M. B.; SANTOS, C. P.; JARDIM, S. S.; CECHIN, S. Z.; LORETO, E. L. S. Molecular and sensory mechanisms to mitigate sunlight-induced DNA damage in treefrog tadpoles. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 3059-3067, 2015b.
- SCHUCH, A. P.; SANTOS, M. B.; LIPINSKI, V. M.; PERES, L. V.; SANTOS, C. P.; CECHIN, S. Z.; SCHUCH, N. J.; PINHEIRO, D. K.; LORETO, E. L. S. Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic treefrog species. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 118, p. 190-198, 2015a.
- SHERMAN, C. K.; MORTON, M. L. Population declines of Yosemite toads in the eastern Sierra Nevada of California. **Journal of Herpetology**, p. 186-198, 1993.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n 5702, p. 1783-1786, 2004.
- SVARTZ, G. V.; WOLKOWICZ, I. R. H.; COLL, C. S. P. Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad *Rhinella arenarum*. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, n. 4, p. 875-881, 2014.
- TOLLEDO, J.; SILVA, E. T.; NUNES-DE-ALMEIDA, C. H. L.; TOLEDO, L. F. Anomalous tadpoles in a Brazilian oceanic archipelago: implications of oral anomalies on foraging behaviour, food intake and metamorphosis Herpetological Society. **The Herpetological Journal**, v. 24, p. 237- 243, 2014.
- WASSERSUG, R. J.; YAMASHITA, M. Plasticity and constraints on feeding kinematics in anuran larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 131, p. 183-195, 2001.
- WASSERSUG, R. J.; HOFF, K. V. S. The kinematics of swimming in anuran larvae. **Journal of experimental Biology**, v. 119, n. 1, p. 1-30, 1985.
- WASSERSUG, R. J. Locomotion in amphibian larvae (or "Why aren't tadpoles built like fishes?"). **American Zoologist**, v. 29, n. 1, 65-84, 1989.
- WASSERSUG, R. J. Tadpole locomotion: axial movement and tail functions in a largely vertebraeless vertebrate. **American Zoologist**, v. 40, n 1, 62-076, 2000.
- WATKINS, T. B. The effect of metamorphosis on the repeatability of maximal locomotor performance in the Pacific tree frog *Hyla regilla*. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 20, p. 2663-2668, 1997.