

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
LABORATÓRIO DE CARCINOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso:

Histologia em isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea): verificando a estrutura cuticular dos esternitos e sua ligação com o tipo de marsúpio

Amanda Porciuncula Horch

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Beatriz de Araujo

Co-orientadora: Dr^a. Camila Timm Wood

Porto Alegre
2018

Histologia em isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea): verificando a estrutura cuticular dos esternitos e sua ligação com o tipo de marsúpio

Amanda Porciuncula Horch

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 2 de Julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Giovanna Monticelli Cardoso

Ma. Tainã Gonçalves Loureiro – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Professora Dra. Paula Beatriz de Araujo – Universidade Federal do Rio Grande do
Sul

AGRADECIMENTOS

Passaram-se cinco anos e meio desde que entrei na biologia até este momento. Cinco anos cheios de alegrias, risadas, saídas de campo e muito aprendizado. Também foram cinco anos com muitas noites em claro estudando para provas ou fazendo trabalhos, analisando dados e lendo artigos. O meu eterno obrigada à minha família que me apoiou de modo incondicional durante esse tempo. Um agradecimento especial à minha mãe Clarice e minha irmã Vittoria que sempre estiveram dispostas a escutar meus problemas e me ajudar, sem falar das várias vezes que elas pacientemente assistiram diversos ensaios de apresentações (como congressos e SIC). Às minhas amigas do Biologismo, minha imensa gratidão por estarem presentes não só nos momentos bons, mas também nos ruins.

Desses cinco anos e meio, um pouco mais de dois anos eu passei no Laboratório de Carcinologia. Muito obrigada à minha orientadora Paula, por ter me acolhido em 2016 e me ensinado tanto durante esses anos. Muito obrigada também à minha co-orientadora Camila, que teve a paciência de me ensinar todos os métodos que utilizei neste trabalho. À Tainã, pela confiança e orientação durante meu primeiro projeto no laboratório. Aos colegas de laboratório que tanto animaram meus dias com muitas risadas, mas também muito trabalho e apoio: Ana, Augusto, Diego, Felipe, Giovanna, Kelly, Karmine, Mari, Mariana e Pedro. À Brenda, técnica do Laboratório de Histologia do Departamento de Zoologia, por todo o auxílio durante esse TCC.

A Dra. Giovanna Monticelli Cardoso e a Ma. Tainã Gonçalves Loureiro por aceitarem participar da banca e avaliar este trabalho.

Agradeço também a PROPESQ - UFRGS pela bolsa de iniciação científica, ao Instituto de Biociências pela verba disponibilizada para execução deste trabalho e ao Laboratório de Carcinologia do Departamento de Zoologia da UFRGS pelo espaço e materiais utilizados.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	10
<i>Espécies analisadas</i>	10
<i>Fixação e preparação histológica das amostras</i>	10
<i>Microscopia óptica</i>	10
<i>Análise de dados</i>	11
RESULTADOS	12
<i>Espessura dos esternitos</i>	12
DISCUSSÃO	13
CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
REFERÊNCIAS	18
FIGURAS	21

RESUMO

As fêmeas da subordem Oniscidea possuem uma bolsa incubadora ventral, delimitada pelos esternitos e oostegitos, chamada de marsúpio. São conhecidos dois tipos de marsúpios: o tipo anfíbio, presente em *Synocheta*, que é aberto e conectado ao sistema condutor de água, e o tipo terrestre, presente em *Crinocheta*, fechado e com cotilédones. O papel dos esternitos nesse processo nunca foi devidamente investigado. Neste estudo, buscou-se verificar se há diferença em suas espessuras entre as duas condições das fêmeas, isto é, ovígeras e não ovígeras nas duas linhagem. Três fêmeas ovígeras e três não ovígeras das espécies *Atlantoscia floridana* (*Crinocheta*) e *Styloniscus spinosus* (*Synocheta*) foram analisadas. A espessura da cutícula dos esternitos envolvidos no marsúpio foi medida e comparada entre as duas condições utilizando técnicas histológicas. Em *A. floridana*, a cutícula é mais fina nos esternitos das fêmeas ovígeras quando comparadas às não ovígeras, indicando que estas possam participar da nutrição e da oxigenação da prole durante a gestação. O marsúpio da linhagem *Synocheta* é pouco conhecido e nunca havia sido estudado em *S. spinosus*. A diferença encontrada na espessura da cutícula do esternito de fêmeas de *S. spinosus* está relacionada à variação das medidas individuais e à condição. Isso significa que um mesmo indivíduo apresenta cutícula com porções finas e porções espessas. Ainda assim, há diferença entre as fêmeas ovígeras e não ovígeras, o que aponta a possibilidade da passagem de substâncias para o interior do marsúpio, visto que na condição ovígera a espessura é menor. Porém, como o marsúpio é aberto nessa espécie, é possível que o sistema condutor de água ainda seja o principal responsável pela nutrição e oxigenação dos ovos em desenvolvimento. Ambas as espécies analisadas no presente trabalho apresentaram uma diferença na espessura da cutícula do esternito quando no período ovígero. Estudos futuros são necessários para averiguar se essa diferença está realmente relacionada com a nutrição e oxigenação da prole.

Palavras-chave: tatuzinhos, fêmeas ovígeras, cutícula, microscopia óptica

ABSTRACT

Females of the suborder Oniscidea have a ventral brood pouch called marsupium, delimited by the sternites and oostegites. There are two types of marsupium within the group: the amphibian type, which is open and connected to the water conducting system, present in Synocheta, and the terrestrial type, which is closed and with cotyledons, present in Crinocheta. The role of the sternites during the gestation period has never been properly investigated. This study aims to verify whether a difference in sternite thickness exists between females in both ovigerous and non-ovigerous conditions of each lineage. Three ovigerous and three non-ovigerous females of the species' *Atlantoscia floridana* (Crinocheta) and *Styloniscus spinosus* (Synocheta) were analyzed. The cuticle thickness of the sternites that are part of the marsupium was measured using histological techniques and compared between the conditions. Results showed that ovigerous females of *A. floridana* have thinner sternite cuticle than non-ovigerous females, indicating that it might participate in the passage of oxygen and nutrients to the offspring during gestation. The marsupium of the Synocheta lineage is poorly known and has never been studied in *S. spinosus*. A difference in the sternite cuticle thickness was also found between the females of *S. spinosus* and is related to both individual variation and condition. This means that the cuticle has thinner and thicker areas within each individual. Nevertheless, there is a difference between ovigerous and non-ovigerous females. It is possible that the thinner parts of the cuticle of the ovigerous females are involved in the passage of substances from the mother to the brood pouch. However, it is likely that the water conducting system is still responsible for most of the nutrients and oxygen brought to the developing eggs since the marsupium is open in this species. Both species analyzed demonstrated a difference in the sternite cuticle thickness between ovigerous and non-ovigerous females. Further studies are necessary in order to determine whether this difference is due to the passage of nutrients and oxygen to the offspring.

Key words: woodlice, ovigerous females, cuticle, light microscopy

INTRODUÇÃO

Os crustáceos são animais com uma extensa variedade de estratégias de reprodução e de cuidado parental (LÓPEZ-GRECO, 2013). Um exemplo dessa diversidade é encontrado na superordem Peracarida, na qual as fêmeas possuem uma bolsa incubadora localizada na parte ventral do pereon, chamada de marsúpio (RICHTER & SCHOLTZ, 2001). Nos isópodos, a bolsa é formada por estruturas foliáceas, conhecidas como oostegitos, que se desenvolvem nas coxas dos pereiópodos 1 a 5 e se sobrepõem na região mediana do corpo (HORNUNG, 2011). Os oostegitos, na maioria dos isópodos, são temporários e estão presentes após uma muda parturial até a próxima muda não parturial (SUTTON, 1980).

No marsúpio, as fêmeas carregam seus ovos fertilizados durante todo o desenvolvimento embrionário (HOESE, 1984) até o nascimento das manca (indivíduo imaturo que apresenta ausência do sétimo par de pereiópodos) (ARAUJO et al., 2004). Assim, a fêmea proporciona proteção mecânica para sua prole, como pode ser observado em espécies aquáticas de vida livre da ordem Isopoda (JANSSEN & HOESE, 1993). O marsúpio de fêmeas aquáticas possui duas aberturas, uma anterior e outra posterior, por onde a água do ambiente circula. Desse modo, o oxigênio e nutrientes são levados para dentro da bolsa, onde são utilizados pelos filhotes. Algumas espécies, como *Iodotea balthica* (Pallas, 1772), desenvolveram modificações nos maxilípodos que auxiliam neste processo e mantêm o fluxo contínuo durante a gestação (HOESE, 1984). No entanto, existem variações morfológicas do marsúpio em diferentes subordens de Isopoda.

A ordem Isopoda é composta por 11 subordens (WORMS, 2018), porém somente a subordem Oniscidea possui representantes terrestres (SCHMIDT, 2008). Os isópodos oniscídeos são popularmente conhecidos como tatuzinhos e podem ser encontrados desde zonas litorâneas até zonas áridas em todos os continentes (exceto Antártica) (ARAUJO & RICHARDSON, 2015). De acordo com a classificação atual, Oniscidea possui cinco linhagens: Ligiidae, Tylidae, Mesoniscidae, Synocheta e Crinocheta (SCHMIDT, 2008). Dessas, somente Synocheta e Crinocheta são consideradas verdadeiramente terrestres. Synocheta possui em torno de 630 espécies, sendo a maioria de tamanho reduzido (por volta de 5 mm) e é encontrada

em ambientes de alta umidade (higrófilos). Crinocheta, por outro lado, compreende cerca de 80% das espécies de Oniscidea, e tendem a habitar ambientes mais secos que espécies de outras linhagens (xerófilos). Na revisão de Schmidt (2008), há a apresentação de uma hipótese sobre a filogenia de Oniscidea, a qual aponta uma relação bastante próxima entre Crinocheta e Synocheta, considerando-as irmãs. Dentre as duas, Crinocheta é vista como a mais derivada.

Os oniscídeos apresentam diversas adaptações para a vida no ambiente terrestre, entre elas o sistema condutor de água e as modificações ocorridas na morfologia do marsúpio (HORNUNG, 2011). O sistema condutor de água consiste em fileiras de escamas ao longo do corpo do animal que transportam água por capilaridade (HOESE, 1981). A água é obtida do ambiente por capilaridade através dos pereiópodos 6 e 7 no sistema do tipo *Ligia*, enquanto no tipo *Porcellio* o mesmo ocorre através dos urópodos (RICHARDSON & ARAUJO, 2015).

São descritos dois tipos de marsúpio dentro de Oniscidea, o tipo anfíbio e o tipo terrestre. Ambos são modificações da morfologia básica do modelo aquático, que é aberto, conforme descrito anteriormente (HOESE, 1984). O tipo anfíbio (Fig. 1) também é aberto, de modo similar ao aquático; porém, nesse caso, há conexão com o sistema condutor de água, que leva oxigênio e nutrientes para a prole (HOESE, 1984; HORNUNG, 2011). Esse tipo de marsúpio é comumente encontrado em Ligiidae, Tylidae e Trichoniscidae (HOESE, 1984). O marsúpio de Mesoniscidae não possui descrição até o momento (SCHMIDT, 2008).

O tipo terrestre de marsúpio (Fig. 2) é completamente fechado e não possui ligação com o sistema condutor de água. Os ovos dessas fêmeas desenvolvem-se envoltos exclusivamente pelo líquido marsupial, o qual é transportado através dos cotilédones (HOESE, 1984). Os cotilédones são prolongações digitiformes que ocorrem nos esternitos 2-6., com função de nutrição e de oxigenação da prole (HOESE, 1984). Schmidt (2008), comenta que aparentemente os cotilédones evoluíram em um sistema de marsúpio fechado, o qual é independente do sistema condutor de água. As espécies podem desenvolver de 4 a 28 cotilédones (LEWIS, 1991), sendo essa diferença relacionada a umidade presente no ambiente (HOESE & JANSSEN, 1989). A bolsa incubadora fechada foi descrita usando *Porcellio scaber* Latreille, 1804 como modelo (HOESE, 1984), mas ela ocorre em todos os Crinocheta (SCHMIDT, 2008).

Os esternitos, assim como toda a superfície dos isópodos, são revestidos por uma camada de cutícula que os separa do ambiente. A cutícula do exoesqueleto é secretada pelas células epiteliais do integumento, e pode ser subdivida em quatro camadas: a epicutícula, a exocutícula, a endocutícula e a camada membranosa (WOOD et al., 2017). A cutícula é composta majoritariamente por quitina e proteínas esclerotizadas, e apresenta camadas calcificadas com altas quantidades de carbonato de cálcio (CaCO_3) (ZIEGLER, 1994). Esse exoesqueleto suporta a forma do corpo, protege contra predação, regula a perda de água para o ambiente, além de possuir estruturas sensoriais e ligação com músculos (SIEDL & ZIEGLER, 2012).

A cutícula que reveste os cotilédones é extremamente fina em certas regiões (CSONKA et al., 2015), podendo ser lisa ou rugosa (HOESE, 1984). O epitélio interno possui morfologia polimórfica, apresentando tanto células cúbicas quanto planas. Vilosidades curtas e irregulares podem ser encontradas em sequência. A maior parte dos cotilédones é preenchida por tecido adiposo que foi acumulado pela fêmea, porém também observa-se a presença de hemolinfa (HOESE & JANSSEN, 1989) e células produtoras de muco (AKAHIRA, 1956). Essas estruturas, assim como os oostegitos, são temporárias e somente se formam durante a muda parturial. De modo geral, o processo é desencadeado após a fertilização dos óvulos e ocorre sob o controle dos hormônios ovarianos (SUZUKI & YAMASAKI, 1989).

Devido à ausência de cotilédones, as fêmeas de *Synocheta* dependem do sistema condutor de água para a nutrição e a oxigenação da prole. Já em *Crinocheta*, há a passagem de substâncias da fêmea para o marsúpio através dos cotilédones. No entanto, o papel dos esternitos nesse processo nunca foi devidamente investigado. Neste estudo, buscamos verificar se há diferenças, na espessura da cutícula dos esternitos, entre fêmeas ovígeras e não ovígeras em ambas as linhagens. A hipótese inicial deste trabalho é de que, durante o período marsupial, os esternitos possuem uma espessura diferente, o que pode estar relacionado à passagem de nutrientes da fêmea para o marsúpio. Espera-se que essa diferença possa ser mais pronunciada em *Synocheta* visto que essa linhagem não possui cotilédones.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies analisadas

As duas espécies selecionadas para análise foram *Atlantoscia floridana* (Van Name, 1940), da família Philosciidae, representando a linhagem Crinocheta; e *Styloniscus spinosus* (Patience, 1907), da família Styloniscidae, representando a linhagem Synocheta. Três fêmeas ovígeras e três não ovígeras de cada espécie foram utilizadas. Os indivíduos foram coletados no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (30°4'15"S, 51°7'12"W), entre Novembro de 2017 e Janeiro de 2018.

Fixação e preparação histológica das amostras

Os espécimes foram crioanestesiados, medidos (largura do cefalotórax, *sensu* SUTTON, 1980), dissecados e fixados em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão Hepes 0,1M, pH = 7,3) por 48 horas a 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão Hepes 0,1M por 10 minutos. As amostras foram desidratadas em série alcoólica por 15 minutos em cada graduação (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 90%, 96%, 96%, absoluto, absoluto) e duas vezes por 20 minutos em xilol. Estas foram infiltradas em parafina I por 12 horas (*overnight*) e em parafina II por 6 horas. Após este processo, as amostras foram emblocadas e os blocos resultantes montados. Cortes parassagitais foram realizados em micrótomo rotatório Leica (Suíça) e coletados com lâminas de vidro. Os cortes possuem entre 6 e 7 µm de espessura. Para a preparação das amostras para histologia o trabalho baseou-se em Wood et al. (2017).

Para coloração, as lâminas foram desparafinizadas com xilol e re-hidratadas em série alcoólica descendente (absoluto, 96%, 96%, 80%, 70%, 70%) até água, por 3 minutos em cada etapa. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) de Harris, sendo posteriormente desidratadas em série alcoólica ascendente, inversamente ao descrito acima para descendente.

Microscopia óptica

Os cortes corados foram examinados e fotografados em microscópio óptico Leica (Suíça) com câmera acoplada utilizando o programa Leica Application Suite. A espessura da cutícula dos esternitos foi medida a partir das fotografias. Dez

medições foram realizadas em cinco cortes selecionados de cada indivíduo utilizando o programa Fiji/ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012; RUEDEN et al., 2017).

Análise de dados

A estrutura do marsúpio foi comparada visualmente entre as espécies. A espessura da cutícula dos esternitos foi comparada entre as condições ovígera e não ovígera em cada espécie. As medidas foram comparadas entre as condições de *A. floridana* utilizando Análise de Covariância (ANCOVA), com a condição como fator fixo, largura do cefalotórax (LC) como cofator e as medições dentro de um mesmo indivíduo como fator aleatório. Devido ao baixo valor de R^2 (0,05) obtido do mesmo modelo para *S. spinosus*, esta análise não foi apropriada. Dessa forma, as espessuras foram normalizadas pela média da LC e comparadas através de Análise de Variância (ANOVA) com fator aleatório, considerando o mesmo fator fixo e o mesmo fator aleatório. Todos os dados foram analisados no programa SPSS (IBM) versão 18. (REF)

RESULTADOS

A largura média do cefalotórax dos indivíduos de *A. floridana* (Fig. 3A) foi de 1,30 mm, enquanto para *S. spinosus* (Fig. 4A) foi de 0,44 mm (Tabela 1). Não houve diferença para essa medida entre as condições das fêmeas em *A. floridana* (Fig. 5A), porém houve diferença em *S. spinosus* (Fig. 5B). As fêmeas ovígeras dessa espécie de *Synocheta* possuem uma largura do cefalotórax maior que as não ovígeras.

O marsúpio de *A. floridana* é fechado, do tipo terrestre (Fig. 3B), como já esperado de uma espécie da linhagem *Crinocheta*. Quatro cotilédones centrais foram observados (Fig. 3B). Em *S. spinosus* o marsúpio parece ser aberto, do tipo anfíbio (Fig. 4B), e como tal não possui cotilédones.

Espessura dos esternitos

A espessura média da cutícula das fêmeas não ovígeras (Fig. 3C) de *A. floridana* foi 1,93 μm , enquanto as fêmeas ovígeras (Fig. 3D) apresentaram espessura média de 1,14 μm . Houve associação entre a espessura e a LC ($R^2 = 0,77$). A diferença da espessura entre as condições ovígera e não ovígera foi significativa ($F_{1;106,22} = 1050,37$; $p < 0,001$) (Fig. 6A), com as fêmeas ovígeras apresentando uma cutícula mais fina. Incorporando as medições em um mesmo indivíduo como variável aleatória no modelo, a mesma significância foi encontrada entre as condições ($F_{1;106,22} = 1050,37$; $p < 0,001$), enquanto não houve diferença entre as medições ($F_{1;49} = 1,12$; $p = 0,35$). Em *S. spinosus* as médias foram de 0,96 μm e 0,91 μm , para fêmeas não ovígeras (Fig. 4C) e ovígeras (Fig. 4D), respectivamente, e houve diferença entre as condições ($F_{1;49}=305,92$; $p<0,001$) (Fig. 6B). Houve também diferença entre as medições em um mesmo indivíduo ($F_{1;49} = 1,69$; $p = 0,035$).

DISCUSSÃO

Em *A. floridana*, a cutícula é mais fina nos esternitos das fêmeas ovígeras quando comparadas às não ovígeras, indicando que a cutícula do esternito possa participar da nutrição e da oxigenação da prole durante a gestação. Nesse caso, a passagem de substâncias da fêmea para o interior da bolsa não estaria restrita somente aos cotilédones, mas também envolveria os esternitos. Estudos anteriores demonstraram que o líquido intramarsupial é transportado através dos cotilédones, e possivelmente, pelo integumento ventral (HOESE, 1984; HOESE & JANSSEN, 1989). Os resultados encontrados para a espécie *A. floridana* no presente trabalho reforçam as evidências histoquímicas previamente apresentadas para outras espécies de Crinocheta (HOESE & JANSSEN, 1989). Contudo, os trabalhos anteriores não haviam medido a espessura da cutícula. A baixa variação da espessura da cutícula dentro de um mesmo indivíduo indica que os esternitos relacionados ao marsúpio estão envolvidos, de alguma forma, com a nutrição da prole na condição ovígera.

Quatro cotilédones foram observados na região mediana dos esternitos 2–5 em *A. floridana*, como já havia sido previamente descrito por Appel (2011). Apesar de centrais, encontram-se levemente deslocados da linha mediana do animal, como pode ser observado nas secções histológicas. Das fêmeas examinadas, nenhuma apresentou a conformação alternativa de oito cotilédones descrita para a espécie (APPEL, 2011). Essa conformação poderia pertencer a outra espécie do mesmo gênero, *A. petronioi* Campos-Filho, Contreira & Lopes-Leitzke, 2012, descrita posteriormente para a mesma região e anteriormente considerada como *A. floridana* (CAMPOS-FILHO et al., 2012).

Fora a família Trichoniscidae, a qual possui o tipo anfíbio de marsúpio (HOESE, 1984), pouco se conhece sobre a estrutura marsupial da linhagem Synocheta. A espécie analisada neste trabalho, *S. spinosus*, foi originalmente descrita como *Trichoniscus spinosus* em 1907 e atribuída posteriormente ao gênero *Styloniscus* (VANDEL, 1952; SCHMALFUSS, 2003). A partir de então, a espécie passou a integrar a família Styloniscidae. Essa mudança taxonômica ocorreu algumas décadas antes de Hoese (1984) analisar o marsúpio de *Trichoniscus pusillus* Brandt, 1833, sendo esta a única investigação realizada até aquele momento em Synocheta.

A espécie *S. spinosus* possui uma bolsa incubadora aberta. Evidências disso podem ser observadas na região anterior e posterior do marsúpio, onde ocorre o encontro dos oostegitos 1 e 5 com os esternitos. Em *A. floridana*, pode-se encontrar a mesma estrutura de fechamento posterior do marsúpio descrita para *P. scaber*, onde o quinto par de oostegitos encontra-se preso por uma almofada a um sulco no esternito 6 (HOESE, 1984). Essa estrutura não ocorre em *S. spinosus* na qual os últimos oostegitos repousam somente sobre a superfície do esternito 6. Provavelmente, essa seja uma característica da família Styloniscidae como um todo; porém, mais espécies precisam ser examinadas, assim como representantes de outras famílias de Synocheta, para que isso possa ser confirmado.

Em *S. spinosus*, não houve associação entre a espessura do esternito e tamanho do animal. Tal associação foi verificada em *A. floridana*. Anteriormente, essa associação foi verificada tanto em Crinocheta como em Synocheta, mas apenas para a espessura cuticular dos tergitos (VITTORI & ŠTRUS, 2014), sem nenhum registro de tal associação para os esternitos. É possível que essa falta de associação entre a espessura da cutícula do esternito e o tamanho do animal ocorra em outras espécies da linhagem Synocheta. Contudo, para reforçar essa evidência seria importante a comparação entre animais de tamanho equivalente, o que não foi possível nesse trabalho devido à dificuldade de se encontrar indivíduos de *S. spinosus*. Além disso, há variação da espessura da cutícula ao longo do esternito o que pode interferir nessa associação.

A diferença encontrada na espessura da cutícula do esternito de fêmeas de *S. spinosus* está relacionada não somente à variação das medidas individuais, mas também à condição. Isso significa que a cutícula apresenta porções finas e espessas dentro de um mesmo indivíduo. Ainda assim, há diferença entre as fêmeas ovígeras e não ovígeras, o que aponta a possibilidade da passagem de substâncias para o interior do marsúpio também em Synocheta, visto que na condição ovígera a espessura é ainda menor. Porém, como o marsúpio é aberto, é possível que o sistema condutor de água ainda seja o principal responsável pela nutrição e oxigenação dos ovos em desenvolvimento. É interessante notar que, diferente de *A. floridana* que possui cotilédones e mais de uma camada de ovos, em *S. spinosus* somente uma camada de ovos foi observada (observação pessoal). Esses, portanto, estão em contato constante com os esternitos da fêmea. Contudo, essa disposição

também pode estar relacionada com o pequeno tamanho da espécie e o espaço disponível para os ovos.

Ambas as espécies analisadas no presente trabalho apresentaram uma menor espessura da cutícula dos esternitos quando no período ovígero. Desse modo, a hipótese inicial deste trabalho se mostrou verdadeira dentro do método utilizado. Esse trabalho é um passo inicial para o entendimento do papel dos esternitos na condição ovígera. Futuros estudos são necessários para averiguar se essa diferença está realmente relacionada com a nutrição e oxigenação da prole.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para *A. floridana* demonstraram que a passagem de substâncias da fêmea para a prole pode não estar limitada aos cotilédones nessa espécie. Outras espécies de Crinocheta precisam ser estudadas a fim de determinar a participação dos esternitos em espécies mais derivadas dentro da linhagem, e se esta possui uma relação filogenética. Pode ainda ter relação com o número, posição e/ou tamanho dos cotilédones. Estudos histoquímicos dos esternitos e experimentos de comportamento com fêmeas ovígeras seriam interessantes para ampliar o entendimento da relação fêmea/prole.

Em *S. spinosus* os resultados obtidos não foram tão claros quanto em *A. floridana*, possivelmente devido à variação individual encontrada ou devido à diferença de tamanho entre as condições. A utilização de outras técnicas para analisar essa espécie, como colorações com um maior contraste, histoquímica e microscopia eletrônica, podem melhor elucidar a diferença encontrada entre as condições. Uma investigação da composição do líquido marsupial nessa espécie poderia auxiliar no entendimento desse tipo de marsúpio e sua dependência do sistema condutor de água. O trabalho atual respondeu algumas perguntas quanto à bolsa incubadora de *S. spinosus*, porém gerou outras.

A falta de uma associação entre a espessura da cutícula do esternito e o tamanho do indivíduo para *S. spinosus* foi inesperada. Essa relação pode existir nos tergitos desses animais, o que indicaria que a ausência de relação nos esternitos está relacionada com a condição ovígera. Uma análise dos tergitos pode ser feita com o mesmo material utilizado neste trabalho. Não foi realizada porque a falta de associação foi inesperada e não houve tempo hábil para tal. No entanto, se demonstrado que a falta de associação existe somente para os esternitos, ela pode estar relacionada a uma questão populacional da espécie. Ou seja, assim como para outras espécies, fêmeas maiores aparecem, nas amostras, sempre ovígeras. A obtenção de fêmeas não ovígeras de tamanhos maiores para essa espécie, experimentalmente, pode ser muito difícil devido à dificuldade de manutenção em laboratório. Uma comparação entre espécies de hábito e tamanho similar, como *Trichoniscus* e *Styloniscus*, poderia esclarecer se a diferença de espessura em um mesmo indivíduo possui alguma relação com o ambiente ou o tamanho da espécie.

Também seria interessante utilizar uma espécie de Crinocheta nessa comparação, como *Trichorhina*, uma espécie de tamanho similar a *Styloniscus*.

REFERÊNCIAS

- AKAHIRA, Y. The function of thoracic processes found in females of the common woodlouse, *Porcellio scaber*. **Journal Faculty of Science Hokkaido University**, v. 12, p. 493–498, 1956.
- APPEL, C. **Análise e descrição de estruturas temporárias presentes no período ovígeno de isópodos terrestres (Crustacea, Oniscidea)**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de ZooloGIA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- ARAUJO, P. B.; QUADROS, A. F.; AUGUSTO, M. M.; BOND-BUCKUP, G. Postmarsupial development of *Atlantoscia floridana* (van Name, 1940) (Crustacea, Isopoda, Oniscidea): sexual differentiation and size at onset of sexual maturity. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 45, n. 3, p. 221–230, 2004.
- CAMPOS-FILHO, I. S.; CONTREIRA, S. G.; LOPES-LEITZKE, E. R. A new species of *Atlantoscia* Ferrara & Taiti, 1981 (Oniscidea: Philosciidae) from Rio Grande do Sul, Brazil. **Nauplius**, v. 20, n. 2, p. 137-144, 2012.
- CSONKA, D.; HALASY, K.; HORNUNG, E. Histological studies on the marsupium of two terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). **ZooKeys**, v. 515, p. 81–92, 2015.
- HOESE, B. Morphologie und funktion des wasserleitungssystems der terrestrischen Isopoden (Crustacea, Isopoda, Oniscoidea). **Zoomorphology**, v. 98, p. 135–167, 1981.
- HOESE, B. The Marsupium in Terrestrial Isopods. **Symposia of the Zoological Society of London**, v. 53, p. 65–76, 1984.
- HOESE, B.; JANSSEN, H. H. Morphological and physiological studies on the marsupium of terrestrial isopods. **Monitore zoologico italiano**, v. 4, p. 153–174, 1989.
- HORNUNG, E. Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: Structure, physiology and behavior. **Terrestrial Arthropod Reviews**, v. 4, n. 2, p. 95–130, 2011.
- JANSSEN, H. H.; HOESE, B. Marsupium morphology and brooding biology of the Antarctic giant isopod, *Glyptonotus antarcticus* Eights 1853 (Crustacea, Isopoda, Chaetiliidae). **Polar Biology**, v. 13, n. 3, p. 145–149, 1993.

LEWIS, F. The relationship between broodpouch cotyledons, aridity and advancement. **Biology of terrestrial isopods Third International Symposium**, v. 104, p. 81–88, 1991.

LÓPEZ GRECO, L. S. Functional anatomy of the reproductive system. In: WATLING, L.; THIEL, M. (Eds.). **The Natural History of the Crustacea: Vol. 1 Functional Morphology and Diversity**. Oxford University Press, p. 413–443, 2013.

RICHARDSON, A.; ARAUJO, P. B. Lifestyle of terrestrial crustaceans. In: WATLING, L.; THIEL, M. (Eds.). **The Natural History of the Crustacea: Vol. 2 Lifestyles and Feeding Biology**. Oxford University Press, p. 299–336, 2015.

RICHTER S.; G. SCHOLTZ. Phylogenetic analysis of the Malacostraca (Crustacea). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 39, p. 113–116, 2001.

RUEDEN, C. T.; SCHINDELIN, J.; HINER, M. C.; DEZONIA, B. E.; WALTER, A. E.; ARENA, E. T.; ELICERI, K. W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 1–26, 2017.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMIDT, B.; TINEVEZ, J. Y.; WHITE, D. J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.

SCHMALFUSS, H. World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). **Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A**, v. 654, p. 1–341, 2003.

SCHMIDT, C. Phylogeny of the Terrestrial Isopoda (Oniscidea): a Review. **Arthropod Systematics & Phylogeny**, v. 66, p. 191–226, 2008.

SEIDL, B. H. M.; ZIEGLER, A. Electron microscopic and preparative methods for the analysis of isopod cuticle. **Zookeys**, v. 176, p. 73–85, 2012.

SUTTON, S. **Woodlice**. Oxford: Pergamon Press, 1980.

SUZUKI, S.; YAMASAKI, K. Ovarian control of oostegite formation in *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). **Zoological Science**, v. 6, p. 11–32, 1989.

VANDEL, A. P. M. Étude des isopodes terrestres récoltés au Vénézuéla par G. Marcuzzi suivie de considérations sur le peuplement du Continent de Gondwana. **La Tipografica Veronese**, 1952.

VITTORI, M.; ŠTRUS, J.. The integument in troglobitic and epigean woodlice (Isopoda: Oniscidea): a comparative ultrastructural study. **Zoomorphology**, v. 133, p. 391–403, 2014.

WOOD, C. T.; KOSTANJŠEK, R.; ARAUJO, P. B.; ŠTRUS, J. Morphology, microhabitat selection and life-history traits of two sympatric woodlice (Crustacea: Isopoda: Oniscidea): A comparative analysis. **Zoologischer Anzeiger**, v. 268, p. 1–10, 2017.

WoRMS. Isopoda. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1131>. Acesso em: 13 Jun. 2018.

ZIEGLER, A. Ultrastructure and electron spectroscopic diffraction analysis of the sternal calcium deposits of *Porcellio scaber* Latr. (Isopoda, Crustacea). **Journal of Structural Biology**, v. 112, p. 110–116, 1994.

FIGURAS

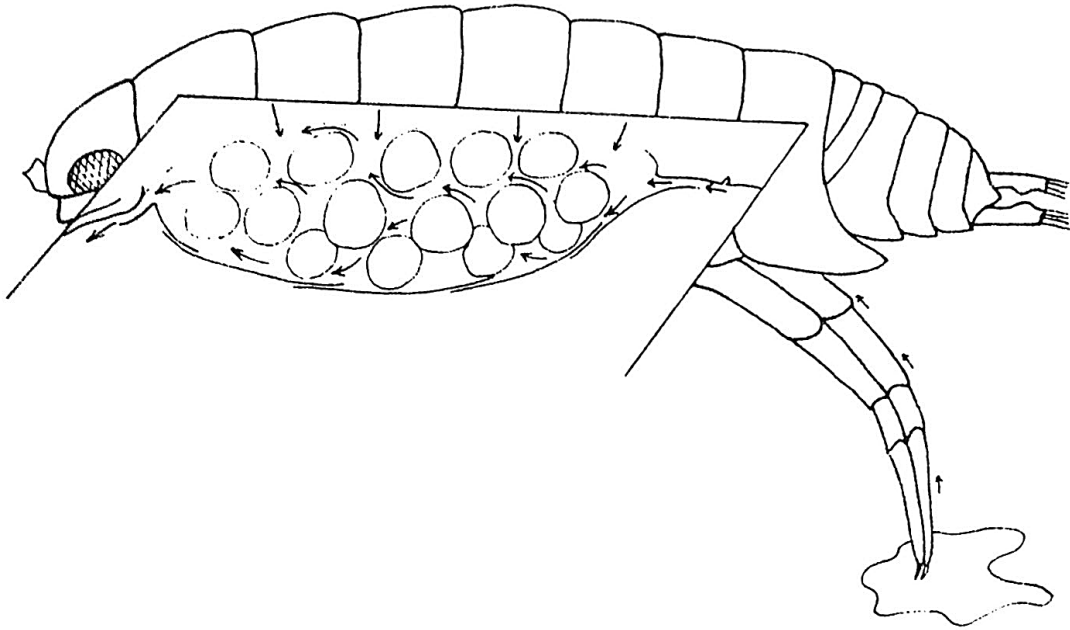


Figura 1. Marsúpio anfíbio (aberto). Setas mostram os dois modos de entrada de água na bolsa. (Fonte: HOESE & JANSSEN, 1989).

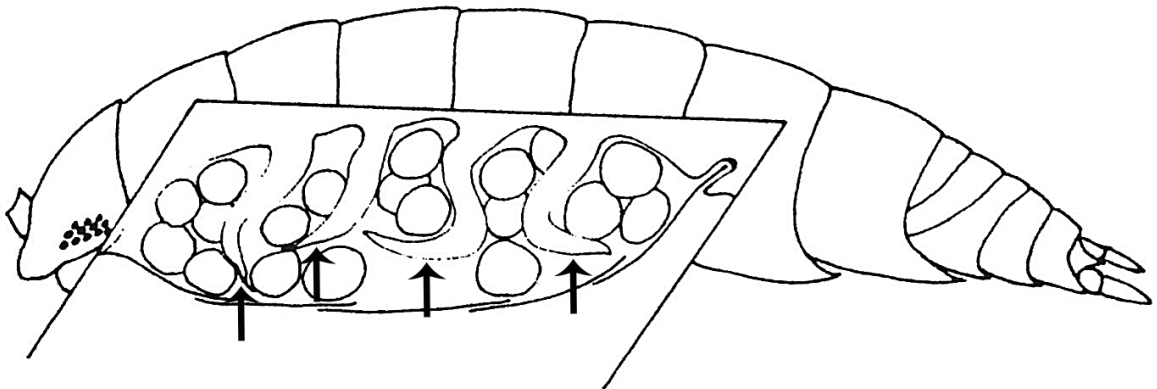


Figura 2. Marsúpio terrestre (fechado), incluindo os cotilédones (setas). (Fonte: HOESE & JANSSEN, 1989).

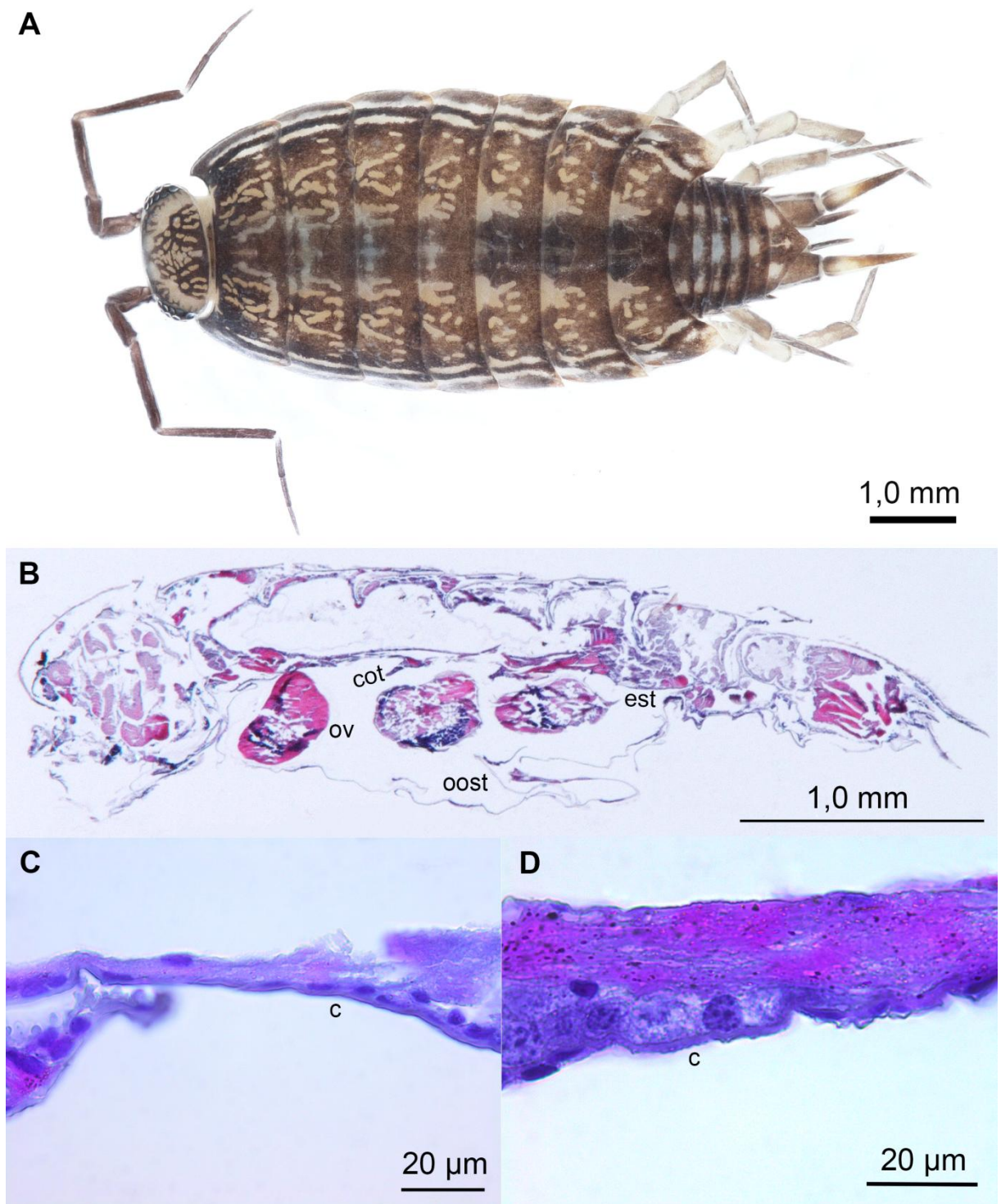


Figura 3. *Atlantoscia floridana*. A) Habitus (Fonte: WOOD et al., 2017). B) Corte parassagital de uma fêmea ovígera corada com HE. C) Corte parassagital do esternito de uma fêmea não ovígera. D) Corte parassagital do esternito de uma fêmea ovígera. Legenda: cot - cotilédone, ov - ovo, oost - oostegito, est - esternito, c - cutícula.

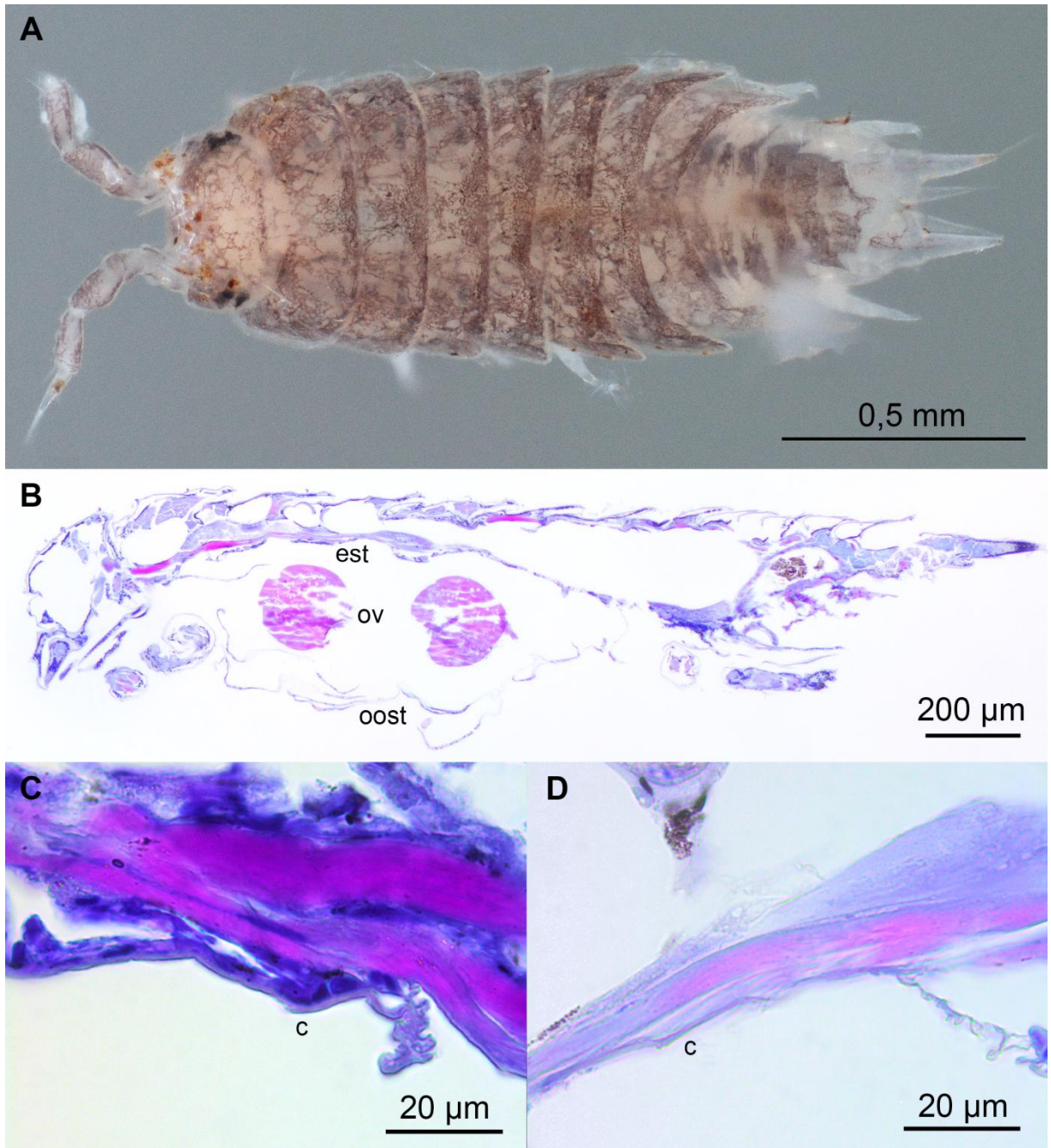


Figura 4. *Styloniscus spinosus*. A) Habitus. B) Corte parassagital de uma fêmea ovígera corada com HE. C) Corte parassagital do esternito de uma fêmea não ovígera. D) Corte parassagital do esternito de uma fêmea ovígera. Legenda: est - esternito, ov - ovo, oost - oostegito, c - cutícula.

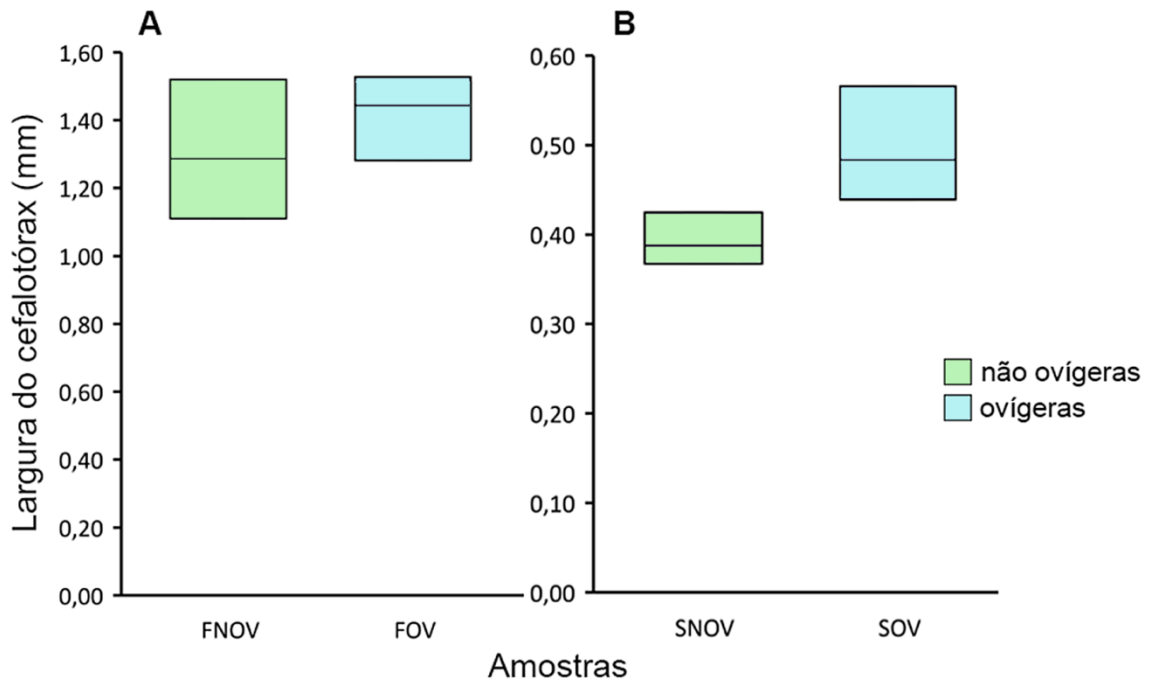


Figura 5. Largura do cefalotórax das fêmeas ovígeras e não ovígeras de A) *Atlantoscia floridana* e B) *Styloniscus spinosus*.

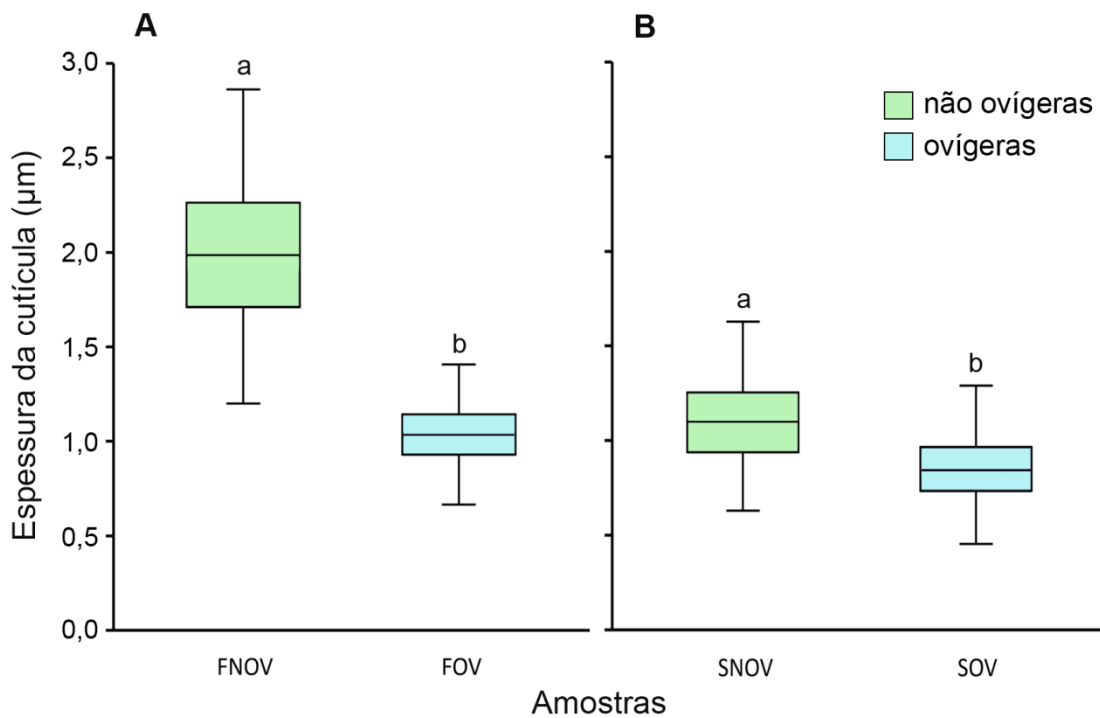


Figura 6. Espessura da cutícula dos esternitos normalizada pela largura do cefalotórax, em fêmeas ovígeras e não ovígeras de A) *Atlantoscia floridana* e B) *Styloniscus spinosus*. Letras diferentes indicam diferença significativa dentro da espécie.

Tabela 1. Largura do cefalotórax e espessura da cutícula dos esternitos para cada fêmea utilizada das espécies *Atlantoscia floridana* e *Styloniscus spinosus*. Médias das espessuras brutas e normalizadas apresentadas como valor (\pm erro padrão).

Espécie	Condição	Indivíduo	LC (mm)	Cortes (n)	Medições (n)	Espessura bruta (μm)	Espessura norm. (μm)
<i>Atlantoscia floridana</i> (Crinocheta)	não ovígera	A	1,24	5	10	1,97 ($\pm 0,3$)	2,07 ($\pm 0,3$)
		E	1,52	5	10	1,91 ($\pm 0,2$)	1,63 ($\pm 0,2$)
		H	1,11	5	10	1,92 ($\pm 0,3$)	2,25 ($\pm 0,3$)
	ovígera	B	1,52	5	10	1,20 ($\pm 0,1$)	1,03 ($\pm 0,1$)
		C	1,28	5	10	1,10 ($\pm 0,2$)	1,15 ($\pm 0,2$)
		D	1,53	5	10	1,20 ($\pm 0,2$)	0,94 ($\pm 0,1$)
<i>Styloniscus spinosus</i> (Synocheta)	não ovígera	9	0,37	5	10	1,05 ($\pm 0,1$)	1,26 ($\pm 0,2$)
		10	0,42	5	10	0,86 ($\pm 0,1$)	0,89 ($\pm 0,1$)
		12	0,37	5	10	0,97 ($\pm 0,1$)	1,15 ($\pm 0,1$)
	ovígera	3	0,44	5	10	0,83 ($\pm 0,1$)	0,82 ($\pm 0,1$)
		5	0,44	5	10	1,00 ($\pm 0,1$)	1,01 ($\pm 0,1$)
		7	0,57	5	10	0,91 ($\pm 0,2$)	0,71 ($\pm 0,1$)