

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO NO
OLHO COMPOSTO DE *Atlantorchestoidea brasiliensis* (CRUSTACEA,
AMPHIPODA) (DANA, 1853)

Arthur Justen Alves

Macaé

Mai de 2016



UFRJ

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO NO
OLHO COMPOSTO DE *Atlantorchestoidea brasiliensis* (CRUSTACEA,
AMPHIPODA) (DANA, 1853)

Arthur Justen Alves

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Isabel Weber da Conceição

Macaé

Maio de 2016

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO NO OLHO
COMPOSTO DE *Atlantorchestoidea brasiliensis* (CRUSTACEA, AMPHIPODA)
(DANA, 1853)

Arthur Justen Alves

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovado por:

Presidente, Prof(a). Laura Isabel Weber da Conceição

Titular, Prof(a). Cintia Monteiro de Barros

Titular, Prof. José Luciano Nepomuceno Silva

Suplente interno, Prof. Alexandre de Azevedo

Suplente externo, Prof. Moises Basilio da Conceição

Macaé, RJ

Mai de 2016

Justen, Arthur Alves.

Estudo da variação do padrão de pigmentação no olho composto de *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Crustacea/Amphipoda) (DANA, 1853)/ Arthur Justen Alves – Macaé : UFRJ, 2016.

109f.; 29,7cm.

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2016.

Referências Bibliográficas: f.78-84.

1. Olho composto. 2. Estrutura ocular. 3. Radiação UVB. 4. Variação populacional. 5 *Atlantorchestoidea brasiliensis*

I. Weber, Laura Isabel da Conceição. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III Estudo da variação do padrão no olho composto de *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Crustacea/Amphipoda).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 A espécie alvo, o anfípode talitrídeo <i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i> (Dana, 1853)	1
1.2 Impacto ambiental em praias arenosas	2
1.3 Padrões de pigmentação no olho composto de <i>A. brasiliensis</i>	3
1.4 Determinação genética.....	4
1.5 OBJETIVOS.....	5
1.5.1 Objetivo Geral.....	5
1.5.2 Objetivos Específicos	5
2. FREQUÊNCIA DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO NO OLHO COMPOSTO DE <i>A. BRASILIENSIS</i> NO LITORAL NORTE FLUMINENSE	6
2.1 INTRODUÇÃO.....	6
2.2 OBJETIVOS.....	7
2.3 METODOLOGIA.....	8
2.3.1 Área de Estudo e Amostragem	8
2.3.2 Avaliação da frequência dos padrões de pigmentação do olho composto de <i>A. brasiliensis</i>	11
2.3.3 Radiação UV-B incidente no período estudado e sua correlação com a frequência dos padrões de pigmentação do olho de <i>A. brasiliensis</i>	14
2.4 RESULTADOS	14
2.4.1 Frequência dos padrões de pigmentação no olho dos anfípodas ao longo da costa no estado de Rio de Janeiro	14
2.4.2 Frequência dos padrões de pigmentação dos olhos entre as praias de Cabiúnas e Comprida do PARNA.....	21

2.4.3. Radiação UV-B incidente durante o período estudado e correlação com a frequência dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode <i>A. brasiliensis</i>	29
3. ESTUDOS DA ALTERAÇÃO INDIVIDUAL DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO DO OLHO COMPOSTO DO ANFÍPODE <i>A. BRASILIENSIS</i> ATRAVÉS DE BIOENSAIOS	31
3.1 INTRODUÇÃO.....	31
3.2 OBJETIVOS.....	32
3.3 METODOLOGIA.....	33
3.3.1 Padronização das condições ideais de manutenção do anfípode <i>A. brasiliensis</i> em laboratório	33
3.3.1.1 Bioensaio 1	33
3.3.1.2 Bioensaio 2.....	34
3.3.1.3 Bioensaio 3.....	35
3.3.2 Efeito do grau de luminosidade no padrão de pigmentação de <i>A. brasiliensis</i> .	36
3.3.2.1 Bioensaio 4.....	36
3.3.2.2 Bioensaio 5.....	37
3.3.2.3 Bioensaio 6.....	38
3.3.3 Avaliação da influência da radiação Ultravioleta no padrão de pigmentação de <i>A. brasiliensis</i>	39
3.3.3.1 Bioensaio 7.....	39
3.3.3.2 Bioensaio 8 – Avaliação do efeito da incidência da radiação UVB ao longo do tempo.....	41
3.3.4 Avaliação do efeito da cor do substrato no padrão de pigmentação dos olhos de <i>A. brasiliensis</i> (efeito de camuflagem)	42
3.3.4.1 Bioensaio 9.....	42
3.4 RESULTADOS	44
3.4.1 Padronização das condições ideais de manutenção dos anfípodas <i>A. brasiliensis</i> em laboratório	44
3.4.1.1 Bioensaio 1.....	44
3.4.1.2 Bioensaio 2.....	44
3.4.1.3 Bioensaio 3.....	45
3.4.2 Efeito da incidência luminosa no padrão de pigmentação do olho.....	46

3.4.2.1 Bioensaio 4.....	46
3.4.2.2 Bioensaio 5.....	46
3.4.2.3 Bioensaio 6.....	47
3.4.3 Avaliação da influência da radiação Ultravioleta sobre o padrão de pigmentação de <i>A. brasiliensis</i>	48
3.4.3.1 Bioensaio 7.....	48
3.4.3.2 Bioensaio 8.....	48
3.4.4 Avaliação do efeito da cor do substrato no padrão de pigmentação do olho de <i>A. brasiliensis</i> (efeito de camuflagem).....	49
3.4.4.1 Bioensaio 9.....	49
4. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO OLHO COMPOSTO DE <i>A. BRASILIENSIS</i>	51
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.1.1. O olho composto em crustáceos	51
4.1.2. Estrutura e pigmentação ocular em Amphipoda.....	52
4.2 OBJETIVOS.....	53
4.3 METODOLOGIA.....	54
4.3.1 Microscopia óptica.....	54
4.3.1.1. Fixação dos anfípodes e contagem dos omatídeos.....	54
4.3.1.2. Emblocamento.....	55
4.3.1.3. Cortes histológicos e coloração.....	55
4.3.2. Microscopia eletrônica.....	56
4.3.3. Avaliação de diferenças a nível histológico entre indivíduos classificados externamente com diferentes níveis de pigmentação no olho composto.....	57
4.4 RESULTADOS	57
4.4.1 Caracterização histológica da estrutura do olho composto do anfípode <i>A. brasiliensis</i>	57
4.4.2. Avaliação de diferenças a nível histológico entre indivíduos classificados externamente com diferentes níveis de pigmentação no olho composto.....	59
5 – DISCUSSÃO	69
6. REFERÊNCIAS	78

7. ANEXOS 85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i> (Crustacea, Amphipoda, Talitridae).....	2
Figura 2. Diversos padrões de pigmentação encontrados nos olhos de <i>A. brasiliensis</i>	4
Figura 3. A) Pontos de coleta localizados nas Regiões Norte Fluminense e dos Lagos entre o município de Quissamã e Armação de Búzios: (QM) praia de João Francisco; (CP) praia de Carapebus; (CO) praia Comprida; (CB) praia de Cabiúnas; (BA) praia do Barreto; (FR) praia do Francês, Arquipélago de Sant'Anna; (CA) praia Campista; (CV) praia de Cavaleiros; (MN) praia de Mar do Norte; (RA) praia Rasa. B) Mapa do Brasil, com destaque para a região onde o estudo foi realizado.	10
Figura 4. Armadilhas do tipo "pit - falls" utilizadas para capturar o anfípode <i>A. brasiliensis</i> no presente estudo.	11
Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de omatídeos pigmentados e não pigmentados e os respectivos padrões de pigmentação encontrados em <i>A. brasiliensis</i> : 0 (100% pigmentado de preto); 1 (< 100%, ≥ 75% pigmentado); 2 (< 75%, ≥ 50% pigmentado); 3 (< 50%, ≥ 25% pigmentado); 4 (<25% pigmentado à total ausência de pigmento).	13
Figura 6. Histogramas da distribuição das frequências dos padrões de pigmentação dos olhos em <i>A. brasiliensis</i> nas dez praias do Norte-Fluminense e Região dos Lagos. (QM) praia de João Francisco; (CP) praia de Carapebus; (CO) praia Comprida; (CB) praia de Cabiúnas; (BA) praia do Barreto; (FR) praia do Francês, Arquipélago de Sant'Anna; (CA) praia Campista; (CV) praia de Cavaleiros; (MN) praia de Mar do Norte; (RA) praia Rasa.	16
Figura 7. Frequência (%) dos padrões de pigmentação nos olhos de <i>A. brasiliensis</i> . (QM) praia de João Francisco; (CP) praia de Carapebus; (CO) praia Comprida; (CB) praia de Cabiúnas; (BA) praia do Barreto; (FR) praia do Francês, Arquipélago de Sant'Anna; (CA) praia Campista; (CV) praia de Cavaleiros; (MN) praia de Mar do Norte; (RA) praia Rasa.	17
Figura 8. Histogramas da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação dos olhos encontrados para juvenis, fêmeas e machos de <i>A. brasiliensis</i>	19
Figura 9. Frequência relativa dos padrões de pigmentação encontrados em cada uma das quatro classes de tamanho de <i>A. brasiliensis</i> , no verão de 2015 nas dez praias estudadas.	20
Figura 10. Variação da frequência do anfípode <i>A. brasiliensis</i> coletado nas praias Comprida (A) e Cabiúnas (B) entre 2012 e 2015, com exceção de 2013. (J) juvenis; (F) fêmeas; (FO) fêmeas ovígeras; (M) machos.	23
Figura 11. Histogramas da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação nos olhos do anfípode <i>A. brasiliensis</i> nas praias de Cabiúnas e Comprida nos anos 2012, 2014 e 2015.	24

Figura 12. Histogramas da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação observados na praia de Cabiúnas e Comprida, para juvenis, fêmeas e machos do anfípode <i>A. brasiliensis</i> , para todo o período amostrado (2012, 2014 e 2015).	25
Figura 13. Histograma da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode <i>A. brasiliensis</i> nas praias de Cabiúnas e Comprida.	26
Figura 14. Frequência anual dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode <i>A. brasiliensis</i> na praias de Cabiúnas e Comprida por classes de tamanho.	28
Figura 15. Frequência sazonal dos padrões de pigmentação do anfípode <i>A. brasiliensis</i> nos anos de 2012, 2014 e 2015, e a variação média e máxima do Índice Ultra Violeta para as mesmas estações e anos.....	30
Figura 16. Béqueres de plástico preparados para acondicionarr os anfípodas antes de serem submetidos à incubadora, contendo papel filtro no fundo, e coberta por (0,5mm).	33
Figura 17. Desenho experimental do bioensaio 1 referentes à otimização da manutenção em laboratório dos anfípodas <i>A. brasiliensis</i>	34
Figura 18. Desenho experimental do bioensaio 2 referentes à otimização da manutenção em laboratório dos anfípodas <i>A. brasiliensis</i>	35
Figura 19. Desenho experimental do bioensaio 4 de avaliação do efeito da incidência luminosa no padrão de pigmentação do olho do anfípode <i>A. brasiliensis</i>	37
Figura 20. Desenho experimental do bioensaio 5 de avaliação do efeito da incidência luminosa no padrão de pigmentação do olho do anfípode <i>A. brasiliensis</i>	38
Figura 21. Desenho experimental do bioensaio 6 de avaliação do efeito da incidência luminosa e da escuridão completa, no padrão de pigmentação do olho do anfípode <i>A. brasiliensis</i> em intervalos de tempo curtos.	39
Figura 22. Desenho experimental do bioensaio 7 da avaliação do efeito da radiação ultravioleta no padrão de pigmentação dos olhos do anfípode <i>A. brasiliensis</i>	40
Figura 23. Desenho experimental do bioensaio 8 da avaliação do efeito da incidência da radiação UV-B ao longo do tempo nos padrões de pigmentação do anfípode <i>A. brasiliensis</i>	42
Figura 24. Desenho experimental do bioensaio 9 da avaliação do efeito da cor do substrato no padrão de pigmentação dos olhos do anfípode <i>A. brasiliensis</i> (efeito de camuflagem).....	43
Figura 25. Resultados do bioensaio 2 na avaliação da sobrevivência dos indivíduos nas novas condições de manutenção a temperatura ambiente e manutenção da umidade adicionando água do mar diluída durante todo o bioensaio.	45
Figura 26. A. Representação esquemática de uma secção transversal da cabeça de <i>Gammarus pulex</i> . A célula retinular. A seta aponta para a lâmina basal que delimita o olho. As duas pontas de setas apontam a membrana fenestrada; (OG) gânglio ótico; (CC) cone cristalino; (B) “brain” indicando o cérebro. B. Esquema desenhado do omatídeo de <i>Gammarus pulex</i> . (AC) célula do cone acessório; (AX) axônio; (BL) lâmina	

basal; (C) cutícula; (CC) cone cristalino; (FM) membrana fenestrada; (GC) célula da glia; (H) camada da hipoderme; (RC) célula retinular; (RPC) célula de pigmento refletor. (Modificado de Hallberg et al., 1980).	53
Figura 27. (A) Corte transversal da cabeça do anfípode <i>A. brasiliensis</i> com destaque para o par de olhos compostos. Se destaca o arranjo dos olhos individuais, os omatídeos (OM), firmados pelo cone cristalino (CC), o rabdoma (RB), e as células retinulares com suas bases (BR) onde encontram-se seus núcleos, formam uma faixa escura devido aos pigmentos retiniais. Também observamos a camada externa, a cutícula (CT) e o gânglio óptico (GO). (Aumento 10x).	60
Figura 28. Corte longitudinal da cabeça do anfípode <i>A. brasiliensis</i> , em destaque as estruturas oculares protegidas distalmente pela cutícula (C), com a hipoderme (HP) e a membrana basal (MB) logo abaixo, formando a estrutura externa do olho (Aumento, 10x).....	61
Figura 29. Corte transversal do olho do anfípode <i>A. brasiliensis</i> . Em destaque as células do cone cristalino (CC), os pigmentos retinulares (PR) dispersos no citoplasma das células retinulares (CR) posicionados distalmente ao redor do rabdoma (RB) (Aumento, 40x).....	62
Figura 30. Corte longitudinal do olho de <i>A. brasiliensis</i> . Distalmente observam-se as células do cone cristalino (CC) (Aumento,10x).	63
Figura 31. Corte transversal do olho de <i>A. brasiliensis</i> . Podemos observar na região distal os núcleos das células de pigmento refletivo (NA). Delimitando a região distal da proximal encontra-se a membrana fenestrada (MF), e logo abaixo os núcleos das células retinulares (NR) conectando-se com as células nervosas. O conjunto de células nervosas formado pelos axônios (AX) e as células da glia (CG) são chamados de gânglio óptico. (Aumento, 40x).....	64
Figura 32. Corte longitudinal do olho do anfípode <i>A. brasiliensis</i> ; onde podem ser observados os omatídeos, cada um contendo cinco células retinulares (CR) com os grânulos de pigmento posicionadas ao redor do rabdoma (RB). Entre as células retinulares (R1 à R5) podemos observar a célula R5, de menos tamanho em relação as outras (Aumento, 20x).....	65
Figura 33. Corte longitudinal do olho do anfípode <i>A. brasiliensis</i> . Em destaque as cinco células retinulares (CR) ao redor do rabdoma (RB), de forma ligeiramente estrelada, com os grânulos de pigmentos (Aumento,100x).....	66
Figura 34. Corte transversal do omatídeo do anfípode <i>A. brasiliensis</i> . A) O pigmento refletor (PR) apresenta distribuição somente até a base do cone cristalino. B) Os pigmentos refletores (PR) encontram-se envolvendo o cone cristalino (CC) e sua base (escala 10 µm) (Aumento, 40x).....	67
Figura 35. Esquema representando o omatídeo do olho de <i>A. brasiliensis</i> . (A) corte transversal da região mais distal das células do cone cristalino. (B) corte transversal da base do cone cristalino e início do rabdoma. É possível observar os diferentes níveis de extensão das células retinulares com seus pigmentos ao redor do rabdoma e do cone	

crystalino. Se sugere que o esquema da esquerda representa a posição dos pigmentos na região proximal dos omatídeos; e o esquema da direita quando externamente o omatídeo é visualizado com pigmento preto. 68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Informações referentes aos pontos de coleta dos anfípodes da espécie <i>Atlantorchestoidea brasiliensis</i>	9
Tabela 2. Abundância do anfípode <i>A. brasiliensis</i> coletado nas praias de Cabiúnas e Comprida por estação e ano.	11
Tabela 3. Frequência dos padrões de pigmentação dos olhos em <i>A. brasiliensis</i> no verão de 2015.	16
Tabela 4. Resultados da comparação da frequência dos padrões de pigmentação entre populações vizinhas de <i>A. brasiliensis</i> . Valor calculado de qui quadrado (χ^2_c) comparado com o valor tabelado ($\chi^2_{(4; 0,001)}$).	18
Tabela 5. Comparação das frequências dos padrões de pigmentação 0 em <i>A. brasiliensis</i> entre as quatro classes de tamanho.	20
Tabela 6. Frequência relativa de juvenis, fêmeas e machos do anfípode <i>A. brasiliensis</i> nas praias de Cabiúnas e Comprida entre 2012 e 2015 com exceção de 2013.	23
Tabela 7. Resultados do teste <i>t</i> da comparação da frequência do padrão de pigmentação 0 entre os sexos para cada praia, e entre praias para um mesmo sexo, e entre juvenis e adultos,	25
Tabela 8. Resultados do teste <i>t</i> da comparação da frequência dos padrões de pigmentação 0 e 4 do anfípode <i>A. brasiliensis</i> entre as praias de Cabiúnas e Comprida para cada ano e entre os anos para cada praia.	26
Tabela 9. Resultados do teste <i>t</i> na comparação das praias para a frequência dos padrões de pigmentação 0 e 4 do anfípode <i>A. brasiliensis</i> , durante as estações dos anos de 2012 e 2014.	27
Tabela 10. Resultados do teste <i>t</i> realizado para comparar as frequências dos padrões de pigmentação 0 e 4 do anfípode <i>A. brasiliensis</i> , entre as praias para as estações sem distinção entre os anos de 2012 e 2014.	27
Tabela 11. Frequência dos padrões de pigmentação do anfípode proveniente das praias Campista e Mar do Norte, em junho de 2015.	46
Tabela 12. Padrões de pigmentação observados no bioensaio 5 de 12 h para os grupos de indivíduos da praia Campista e da praia de Mar do Norte.	47
Tabela 13. Mortalidade acumulada observada durante o bioensaio 6.	47
Tabela 14. Padrões de pigmentação iniciais e finais observados nos anfípodes do bioensaio 8, no início e ao final da exposição a radiação UV-B.	48

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenadoria de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de Mestrado, ao Programa Ecológico de Longa Duração, Peld Sítio 5 - CNPQ, pelo financiamento de parte deste estudo, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Conservação – PPGCIAC, à colaboração do Dr. Alexandre Azevedo e a Dra. Cíntia Monteiro de Barros - NUPEM/UFRJ, à colaboração dos professores Dr. Luiz Eduardo Nery e Dr. Marcelo Vargas do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da FURG, à técnica de laboratório Juliana Silva - NUPEM/UFRJ, e ao Dr. Moisés da Conceição.

Agradeço especialmente a minha orientadora Dra, Laura Weber, pela dedicação e entusiasmo com que me orientou durante todo o meu mestrado, proporcionando todos os meios para a realização deste estudo, além de uma experiência incrível de aprendizado, profissionalismo e de amizade.

Agradeço aos meus pais, Elisabete e Edson que sempre apoiaram meus estudos e me incentivaram desde minha infância até hoje, sem o apoio deles não teria chegado onde cheguei. Aos meus avós Edir e Juvêncio que sempre oraram para que meus caminhos fossem iluminados e emanaram força através de seus pensamentos positivos. Ao meu avô Renato com quem aprendi muito em nossas conversas de tempos remotos onde se aguçaram as minhas percepções a respeito do meio ambiente e das alterações causadas pelo homem, aos meus tios, tias e primos. Agradeço aos meus guias espirituais que me guiam e me auxiliam em todos os momentos.

Aos meus amigos, Vitor, Caio, Fabio, Thalys e Matheus que já fazem parte da minha vida a um bom tempo, e foram essenciais para que eu chegasse à Macaé, além de estarem presentes nas discussões acadêmicas, científicas e em outras nem tanto, mas que certamente são e serão amigos que carregarei no peito eternamente com muito carinho.

A Dani e Arthur Bauer, duas pessoas maravilhosas com as quais eu tive o prazer de morar junto e aprender muito. Foi maravilhoso conhecê-los e os levarei no coração pra sempre.

Aos meus colegas de laboratório, Nathália, Helena, Juan, e Thais, que muitas vezes dividiram as bancadas comigo e me apoiaram em minha pesquisa.

Aos bons amigos que fiz no Nupem, Alan, Paula, Ranyele, Laissa (flor), Mari, Marizinha, Hudson, Lupis, Hélio, Marco, Nany, Sayuri, Rafael, Thiago, Samambaia, Gustavo, Leozen, Rebeca, Marcele, Zé, Jorge. Obrigado pelas conversas, pelos cafés, e por tornarem meu local de estudo e trabalho mais agradável e feliz com a presença de vocês.

RESUMO

ESTUDO DA VARIAÇÃO DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO NO OLHO COMPOSTO DE *Atlantorchestoidea brasiliensis* (CRUSTACEA, AMPHIPODA)

Arthur Justen Alves

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Resumo da dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação

Texto do Resumo

Durante as coletas do projeto Peld-Sítio 5 (CNPq) foram observados diferentes padrões de pigmentação no olho composto de *A. brasiliensis*, nas diferentes áreas amostradas. Desta forma o presente estudo procurou identificar as possíveis causas destes padrões de pigmentação. Com este objetivo foi determinada a distribuição dos padrões de pigmentação dentro e entre populações; foi avaliado o efeito da luminosidade, da radiação UV-B e da cor do substrato, mediante bioensaios; e foi também caracterizada a estrutura e ultra-estrutura do olho composto de *A. brasiliensis*. Os padrões de pigmentação não apresentaram um padrão definido ao longo de um gradiente geográfico, entretanto constatou-se que os padrões encontrados dependem da localidade da qual os anfípodes provêm ($\chi^2_c = 299,5$; $\chi^2_t = 67,985$; $gl = 36$; $p = 0,001$). Observou-se o predomínio do padrão 0 entre os juvenis (<4,0 mm) e o predomínio dos padrões 3 e 4 entre os adultos, comprovando que há um aumento dos padrões com poucos omatídeos pigmentados com o aumento do tamanho do anfípode. A radiação ultravioleta não teve efeito num curto prazo sobre os padrões de pigmentação dos olhos do anfípode *A. brasiliensis*, nem a incidência luminosa num fotoperíodo de 12/12 h, mostrando não estar relacionado a um comportamento circadiano. Na análise da estrutura e ultra-estrutura do olho composto deste anfípode mostrou que em média $358,2 \pm 63,8$ omatídeos compõem o olho composto. O padrão de pigmentação individual do olho não é consistentemente afetado pelos fatores (alteração do

fotoperíodo, incidência luminosa direta, escuridão completa, radiação UV-B, e alteração da cor do substrato) na dose e tempo induzidos. Finalmente, os resultados deste estudo sugerem que a alteração da frequência dos padrões de pigmentação do olho do anfípode *A. brasiliensis* seja um fenômeno individual e não populacional.

Palavras chave: olho composto, estrutura ocular, radiação UVB, variação populacional, *Atlantorchestoidea brasiliensis*

ABSTRACT

During field collections of Peld-Sítio 5 (CNPq) project, were observed different pigmentation patterns of the compound eye of *A. brasiliensis*. Therefore, raised the need to determine the possible causes of these pigmentation patterns. With this aim, the distribution of the pigmentation patterns within and between populations was determined; the effect of light incidence, UV-B irradiation, and different colour substrates was evaluated through bioassays; and also the structure and ultra-structure of the compound eye of *A. brasiliensis* was described. Pigmentation patterns did not show a defined pattern along ten localities sampled at the Norte-Fluminense and Region dos Lagos coastline, but they are dependent on the locality the amphipods came from ($\chi^2_c = 299,5$; $\chi^2_t = 67,985$; $gl = 36$; $p = 0,001$). It was observed the predominance of the 0-pattern within the juveniles (<4,0 mm) and the predominance of the 3- and 4-patterns within the adults, demonstrating that there is an increase in number of those patterns, with less number of pigmented ommatídea, as amphipods became larger. UV irradiation did not have a short-term effect on the eye pigmentation patterns observed in *A. brasiliensis*, neither light incidence on a 12/12 h photoperiod, showing not to be related to a circadian behaviour. The analysis of the compound eye structure of the amphipod showed that on average 358.2 ± 6.8 ommatidean compose the compound eye of the amphipod.; individual eye pigmentation patterns are not consistently affected by the factors (photoperiod changes, direct light incidence, full darkness, UV-B irradiation, and background colour change) at the dose and time induced. Finally, the results of the present study suggest that the change in eye pigmentation patterns frequency may be an individual phenomena rather than a population process,.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A espécie alvo, o anfípode talitrídeo *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Dana, 1853)

As praias arenosas são consideradas um dos ambientes mais dinâmicos do mundo (Short, 1999), sendo fortemente influenciadas pela ação de ondas e marés, capazes de alterar e moldar suas características físicas. Dentre os crustáceos encontrados em praias arenosas destacam-se os representantes da família Talitridae, como os únicos anfípodes a colonizarem os ambientes terrestres e semiterrestres (Serejo, 2004). As formas semi-terrestres, também conhecidas como *sandhoppers* são cavadoras e habitam a areia de praias tropicais e temperadas. Caracterizam-se por permanecer grande parte do dia enterrados na areia, como um meio de se proteger da predação e dissecação, assim como de reduzir a probabilidade de serem arrastados pelas ondas e pela maré. No anoitecer e durante a noite, estes emergem para se alimentar dos restos de matéria orgânica depositados pelas ondas nas regiões do intermaré superior e do supramaré, localizados sobre a linha da água. (Cardoso e Veloso, 1996).

Entre as espécies brasileiras de *sandhoppers*, podemos citar o *Atlantorchestoidea* (= *Pseudorchestoidea*) *brasiliensis* (Dana, 1853), realocada no novo gênero *Atlantorchestoidea* por Serejo (2004) (Figura 1). *A. brasiliensis* é a espécie da macro-fauna de maior importância na estruturação das comunidades das praias arenosas expostas da costa do Rio de Janeiro (Cardoso, 2002); habitando o médio e supra litoral de praias expostas, desde o Sudeste do Brasil (Espírito Santo) até o Uruguai (Cardoso e Veloso, 1996; Gómez e Defeo, 1999), não registrada no Paraná (Rosa et al., 2007). Esta espécie se reproduz durante todo o ano (Cardoso e Veloso, 1996) e apresenta desenvolvimento direto e baixas taxas de fecundidade. De acordo com (Cardoso e Veloso, 1996), *A. brasiliensis* apresenta maior proporção de fêmeas que de machos nas praias do Rio de Janeiro; apresentando uma média de fecundidade de 2,8 juvenis por eclosão e uma longevidade de 12-21 meses. Nesta espécie, estes autores também observaram que os juvenis são mais ativos durante o dia, enquanto os adultos são mais ativos durante a noite.

Ecologicamente, os *sandhoppers* são importantes consumidores dos depósitos de algas e matéria orgânica (*debris*) de praias arenosas e, portanto, teriam uma importante participação no desaparecimento da linha de *debris* destas praias (Colombini et al.,

2000). Os *sandhoppers* são os primeiros colonizadores de depósitos frescos de algas nas praias e correspondem a macro-fauna consumidora mais importante (Colombini et al., 2000). Esta espécie, assim como outros *sandhoppers*, são bons indicadores de urbanização e atividades recreacionais nas praias arenosas (Veloso et al., 2009; Defeo et al., 2009). Assim como todas as espécies que fazem parte das comunidades de praias arenosas sofrem sérios impactos por causas antrópicas (Defeo et al., 2009), entre as quais podemos citar: a recreação, a limpeza das praias durante o verão, a urbanização da orla, e as mudanças climáticas.



Figura 1. *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Crustacea, Amphipoda, Talitridae)

1.2 Impacto ambiental em praias arenosas

Uma infinidade de fatores impactam os ecossistemas em todo o mundo, afetando toda a biodiversidade destes ambientes. Não seria de se esperar que o contrário fosse observado nas praias arenosas, tendo em vista a grande expansão das cidades próximas às zonas costeiras, com a ampla utilização das praias para fins recreativos, o aumento do aporte de esgoto lançado deliberadamente nos ambientes marinhos, entre muitos outros (Defeo et al., 2009). Habitantes nativos das praias arenosas, os anfípodes *A. brasiliensis* são constantemente submetidos a toda essa variedade de distúrbios que em sua maioria tem origem antrópica e estendem-se além dos naturalmente causados por ressacas, chuvas e ventos. A presença de metais pesados nos tecidos de anfípodes pode influenciar a orientação destes animais em relação ao sol (Ungherese e Ugolini 2009). Estes crustáceos tem sido amplamente utilizados como indicadores de urbanização (Veloso et al., 2008, 2009), como bioindicadores de contaminação das praias por

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Ugolini et al., 2012); e como biomonitorios através de estudos que relacionam a contaminação por traços de metais.

1.3 Padrões de pigmentação no olho composto de *A. brasiliensis*

Durante o desenvolvimento dos estudos de longa duração (PELD-Sítio 5, CNPq), foi avaliada a variação genética da espécie *A. brasiliensis* na região do Norte-Fluminense, sazonalmente desde 2011 até 2013. Durante esse período, no qual era necessário identificar baixo microscópio estereoscópico, o sexo e o estado reprodutivo das fêmeas, foi constatada uma variação na distribuição da pigmentação do olho, sendo esta, mais frequente em algumas amostragens do que em outras. A partir destas observações iniciais dos diferentes padrões de pigmentação, nosso estudo procurou destrinchar minuciosamente as causas que pudessem causar esse fenômeno tão interessante e intrigante (Figura 2).

Em isópodes tem sido observado que a ausência parcial de pigmento na superfície do olho em alguns indivíduos pode ter uma causa exógena (ambiental), que leve a algum dano somático nas células da retina ou à alteração da quantidade ou posição dos pigmentos nas diferentes regiões do olho composto.

Meyer-Rochow (2001) estudou as alterações e adaptações a luz e escuridão dos fotorreceptores dos olhos dos crustáceos e constatou que excessos de incidência de luz e de tempo de exposição podem causar danos que muitas vezes podem se tornar irreversíveis para os olhos dos crustáceos.

A ação biológica da radiação UV-B tem sido apontada como maléfica, e causadora de doenças em seres humanos, fato esse que também despertou interesse da comunidade científica para estudos dos efeitos da radiação em animais e nos ecossistemas (McCullough e Porter, 1971; Kane, 1998; Gouveia et al., 2004, 2005; Huebner et al., 2009). Anzalone et al. (1998) encontrou fortes evidências da influência negativa da radiação UV-B em anfíbios. Connolly et al. (2009) observou o efeito da radiação UV-B em *Daphnia*, observando que sua capacidade de reparar danos causados pela UV-B, através do mecanismo de reparo por excisão, ocorre apenas a temperaturas abaixo de 10°C.

Filgueira et al. (2010) observou que a radiação UV-A e UV-B são capazes de induzir a migração dos pigmentos retiniais nos olhos pedunculados de caranguejos.

Outros autores apontam que crustáceos expostos a qualquer radiação UV, respondem com rápida dispersão dos pigmentos dentro dos cromatóforos (Gouveia et.al., 2004).

Com a diminuição de parte da camada de ozônio decorrente da emissão de gases poluentes, os raios UV-B tem entrado na atmosfera mais facilmente, além do fato da radiação ser acentuada em menores latitudes e maiores altitudes (Kirchhoff, 2000). Por *A. brasiliensis* ser semiterrestre, e passar grande parte do tempo sob influência direta da radiação solar nas praias, esta espécie está mais suscetível aos raios UV-B do que seus representantes aquáticos que se beneficiam da coluna d'água, capaz de filtrar parte dos raios UV. Portanto, não podemos descartar que o padrão observado em *A. brasiliensis* possa ser uma alteração fisiológica ou um dano nas células retiniais. Sendo esta primeira, portanto, nossa primeira hipótese de trabalho.

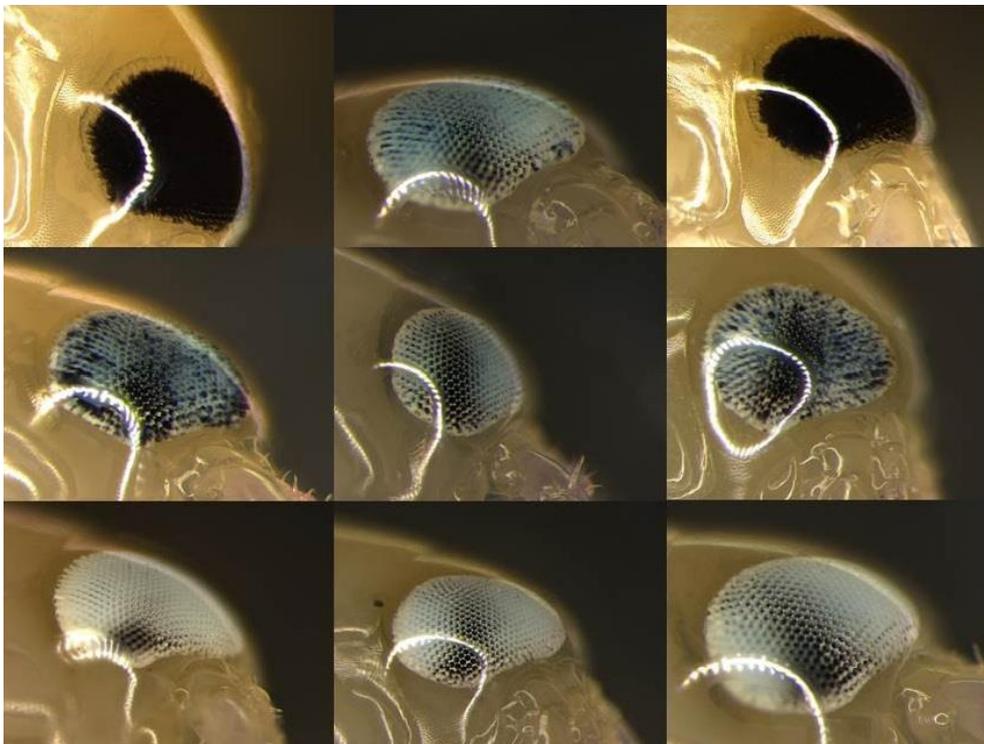


Figura 2. Diversos padrões de pigmentação encontrados nos olhos de *A. brasiliensis*

1.4 Determinação genética

Inicialmente, a variação dos padrões de pigmentação no olho composto de *A. brasiliensis* foi denominada de variegação, baseado no nome dado ao caso da distribuição da pigmentação do olho em *Drosophila spp.*, onde o fenótipo mosaico observado resulta de uma variação célula a célula da expressão gênica do gene

responsável pela pigmentação do olho (Wakimoto, 1998). Este mosaicismo ocorre por um fenômeno descrito pela primeira vez por Müller em 1930, após induzir a translocação do gene da cor dos olhos (vermelho/branco) mediante a exposição de embriões a raios X. Este fenômeno conhecido como variegação por efeito de posição (*PEV: position effect variegation*), consiste num evento epigenético, onde não há mudança na sequência do DNA (Wakimoto, 1998). No entanto, ocorre um arranjo cromossômico que desloca o gene da cor do olho desde sua posição na eucromatina para uma posição próxima da heterocromatina (Seum et al., 1996). Modificadores de *PEV* também teriam uma importante contribuição na variegação observada nos olhos de *Drosophila spp.*, os quais seriam genes supressores (*Su(var)s*) e amplificadores (*E(var)s*) de *PEV*, componentes estruturais da heterocromatina (Wakimoto, 1998).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Esclarecer as causas dos diferentes padrões de pigmentação no olho do anfípode talitrídeo *Atlantorchestoidea brasiliensis*.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar a distribuição dos padrões de pigmentação dentro e entre populações.
- Caracterizar a estrutura e a ultra-estrutura do olho composto de *A. brasiliensis*.
- Avaliar o efeito da variação de fatores ambientais sobre o padrão de pigmentação do anfípode *A. brasiliensis*

2. FREQUÊNCIA DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO NO OLHO COMPOSTO DE *A. BRASILIENSIS* NO LITORAL NORTE FLUMINENSE

2.1 INTRODUÇÃO

Os *sandhoopers* são amplamente caracterizados por sua relação com o ambiente praiar, enterrando-se durante o dia para proteger-se de predadores e da desidratação, e emergindo durante a noite em busca de alimento. Estes animais apresentam um comportamento migratório, locomovendo-se no eixo terra-mar, hora em direção ao mar em busca das zonas mais úmidas da praia, hora em direção ao continente, evitando ficar submerso pelo avanço das marés (Cardoso, 2002; Ugolini et al., 2007). Para se orientar na praia e saber a direção correta a seguir, os anfípodes talitrídeos utilizam-se de inúmeras referências capturadas através de diferentes sensores, dos quais destacam-se os olhos como os principais detectores de luz, provendo a estes animais a capacidade de detectar os diferentes comprimentos de ondas e dando-lhes a possibilidade de orientação através do sol e da lua (Scapini, 2006; Ungherese e Ugolini, 2009; Ugolini, 2014). De fato, poucos artrópodes, como os “*sandhoopers*” utilizam a lua e o sol como bússolas. A capacidade destes anfípodes em utilizar estas pistas para se dirigirem ao mar, lhes permite traçar as rotas mais curtas (Ugolini et al., 2007), determinando ativamente a direção de seus movimentos na praia de acordo com seu estado interno e com as características do ambiente (Scapini 2006).

Muitos estudos em crustáceos tem focado nos aspectos fisiológicos e comportamentais de respostas óticas (Barnes e Nalbach, 1993; Blanke et al., 1997; Barnes et al., 2002; Zeil e Hemmi, 2006). Os primeiros experimentos que abordaram questões comportamentais sobre orientação com anfípodes talitrídeos foram realizados por Williamson (1951) e Pardi e Papi (1952, 1953) com *Talitrus Saltator* observando a trajetória destes através da praia orientados pelo sol e pela lua. Mais recentemente, uma série de estudos mostraram como se relacionam os aspectos comportamentais com a capacidade destes animais em detectar diferentes comprimentos de onda dos astros (sol/lua), durante diferentes fases do dia e da noite em diferentes situações, e como estes mecanismos de detecção podem influenciar os padrões de localização e distribuição dos *sandhoopers* na praia (ver Forward et al., 2009; Rossano et al., 2009; Scapini e Dugan, 2008; Ugolini et al., 2007, 2009; Mezzetti et al., 2010b; Ugolini, 2014).

A observação durante as coletas do projeto Peld-Sítio 5 (CNPq) da variação dos padrões de pigmentação no olho composto de *A. brasiliensis*, e a aparente distribuição diferencial dos mesmos nas diferentes áreas amostradas, levaram à necessidade de estudar a relação destes com fatores externos e sua frequência nos diferentes estágios de desenvolvimento destes anfípodes.

2.2 OBJETIVOS

- Determinar a frequência dos padrões pigmentação nos olhos compostos de *A. brasiliensis* ao longo da costa Norte Fluminense, RJ.
- Determinar a variação temporal da frequência dos padrões de pigmentação no olho composto de *A. brasiliensis* nas praias de Cabiúnas e Comprida.
- Avaliar o efeito do gênero e do estado de desenvolvimento na variação dos padrões de pigmentação do olho composto de *A. brasiliensis* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA).
- Determinar se há relação entre a incidência solar (radiação UV-A e UV-B) na variação da frequência dos padrões de pigmentação no olho composto de *A. brasiliensis* ao longo da costa do Norte Fluminense, RJ

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Área de Estudo e Amostragem

As coletas para análise da frequência dos padrões de pigmentação do olho composto de *A. brasiliensis* foram realizadas em novembro e dezembro de 2014 em dez praias do litoral Norte-Fluminense e da Região dos Lagos (Tabela 1; Figura 3), nas seguintes localidades do estado do Rio de Janeiro: 1) praia de João Francisco, Quissamã; 2) praia da barra da lagoa de Carapebus, Carapebus; 3) praia da barra da lagoa Comprida, Macaé; 4) praia da barra da lagoa de Cabiúnas, Macaé; 5) praia do Barreto, Macaé; 6) praia do Francês, ilha oceânica no Arquipélago de Sant’Anna, Macaé; 7) praia Campista, Macaé; 8) praia de Cavaleiros, Macaé; 9) praia de Mar do Norte, Rio das Ostras; e 10) praia Rasa, Búzios.

As coletas para a análise temporal da variação do padrão de pigmentação do olho composto de *A. brasiliensis*, foram realizadas dentro do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, cujo arco praial estende-se por 44 km, delimitando a divisão entre o mar e as 18 lagoas costeiras da área protegida pelo parque (ICMBIO, 2014). As coletas foram realizadas entre os outonos de 2012 e 2015, em duas praias adjacentes as lagoas de Cabiúnas e Comprida (Tabela 2).

Os anfípodes foram coletados com armadilhas tipo “pit-fall”, que consistiram em dez potes plásticos com aproximadamente 10 cm de diâmetro de abertura, preenchidos com aproximadamente 3 cm de álcool 92,8. Os potes foram enterrados na areia e distribuídos aleatoriamente na região de varrido deixada durante a maré baixa (Figura 4). Todos os indivíduos coletados foram levados ao laboratório para análises posteriores.

Tabela 1. Informações referentes aos pontos de coleta dos anfípodes da espécie *Atlantorchestoidea brasiliensis*.

Praia	Localidade	Data	Coordenada	n
João Francisco	Quisamã	10/12/2014	22°19'39,8" S; 41°44'06,9" W	50
Carapebus	Carapebus	10/12/2014	22°19'39,4" S; 41°44'09,9" W	50
Comprida	Macaé	19/11/2014	22°19'39,4" S; 41°44'09,4" W	100
Cabiúnas	Macaé	19/11/2014	22°17'56,9" S; 41°41'18,0" W	100
Barreto	Macaé	04/12/2014	22°19'55,5" S; 41°43'50,6" W	50
Francês	Macaé	06/12/2014	22°24'06,5" S; 41°41'43,3" W	50
Campista	Macaé	08/12/2014	22°19'39,2" S; 41°44'08,9" W	50
Cavaleiros	Macaé	08/12/2014	22°24'31,9" S; 41°43'12,0" W	50
Mar do Norte	Rio das Ostras	16/12/2014	22°19'09,8" S; 41°44'06,9" W	44
Rasa	Búzios, RJ	18/12/2014	22°19'39,4" S; 41°44'09,9" W	50

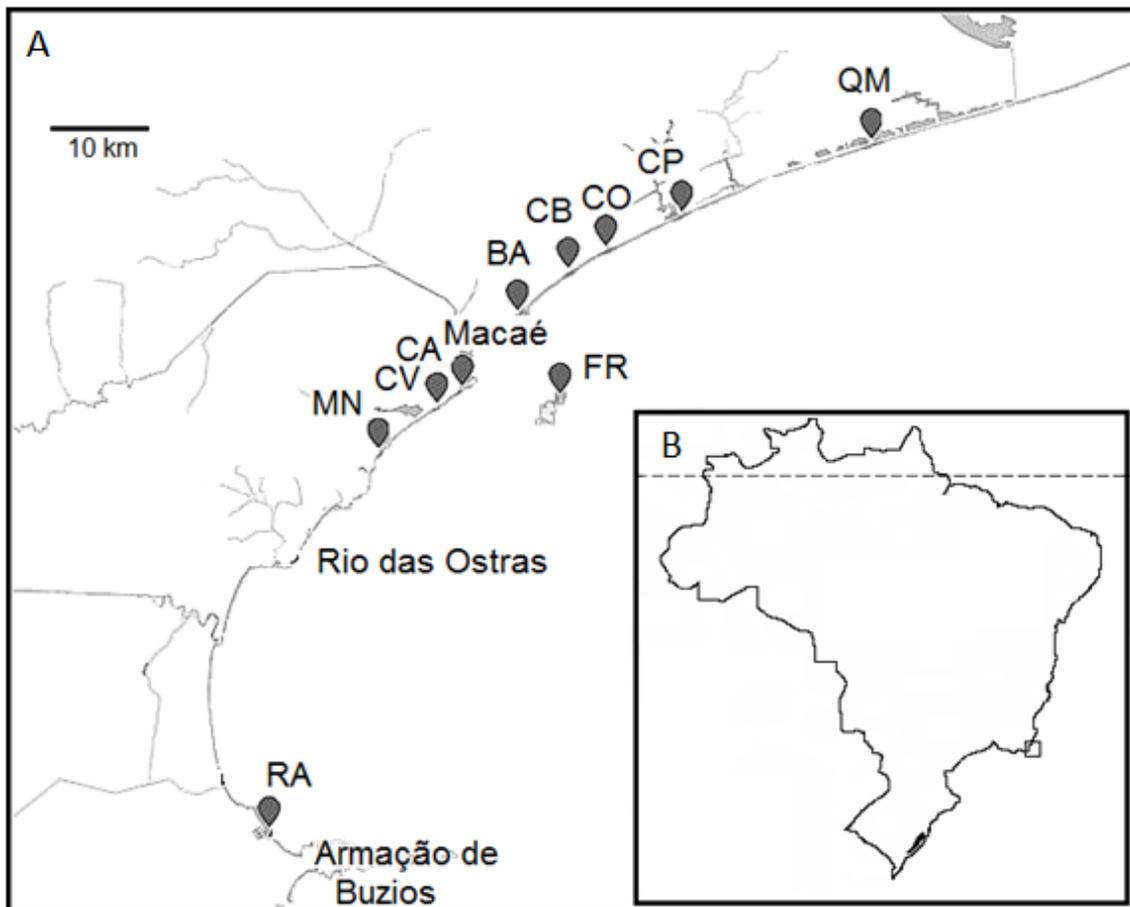


Figura 3. A) Pontos de coleta localizados nas Regiões Norte Fluminense e dos Lagos entre o município de Quissamã e Armação de Búzios: (QM) praia de João Francisco; (CP) praia de Carapebus; (CO) praia Comprida; (CB) praia de Cabiúnas; (BA) praia do Barreto; (FR) praia do Francês, Arquipélago de Sant'Anna; (CA) praia Campista; (CV) praia de Cavaleiros; (MN) praia de Mar do Norte; (RA) praia Rasa. B) Mapa do Brasil, com destaque para a região onde o estudo foi realizado.

Tabela 2. Abundância do anfípode *A. brasiliensis* coletado nas praias de Cabiúnas e Comprida por estação e ano.

Ano	Estação							
	Verão		Outono		Inverno		Primavera	
	Local	N	Local	N	Local	N	Local	N
2012	-	-	Comprida	109	Comprida	150	Comprida	370
			Cabiúnas	62	Cabiúnas	112	Cabiúnas	290
2014	-	-	Comprida	110	Comprida	110	Comprida	100
			Cabiúnas	110	Cabiúnas	100	Cabiúnas	100
2015	Comprida	100	Comprida	100	-	-	-	-
	Cabiúnas	100	Cabiúnas	100				

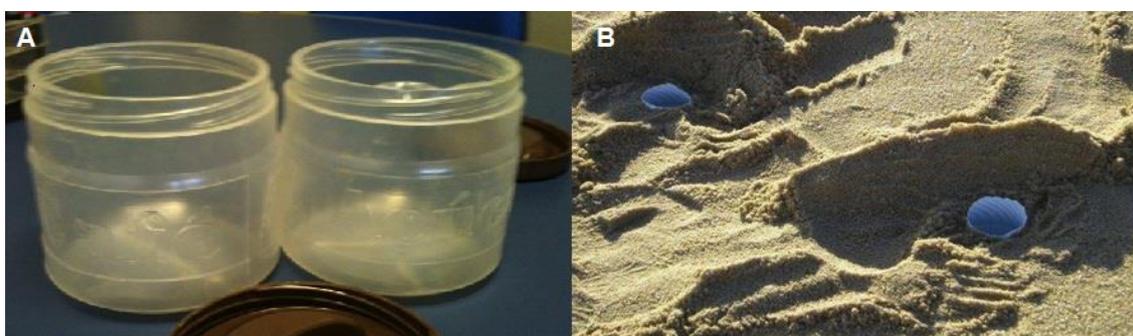


Figura 4. Armadilhas do tipo "pit - falls" utilizadas para capturar o anfípode *A. brasiliensis* no presente estudo.

2.3.2 Avaliação da frequência dos padrões de pigmentação do olho composto de *A. brasiliensis*

Os anfípodes coletados no período do estudo foram caracterizados em laboratório. Todos foram medidos com paquímetro digital (0,01 mm), sexados e classificados de acordo com a quantidade de pigmento na região distal dos omatídeos, em 5 níveis: 0 (100% pigmentado de preto); 1 (< 100%, ≥ 75% pigmentado); 2 (< 75%, ≥ 50% pigmentado); 3 (< 50%, ≥ 25% pigmentado); 4 (<25% pigmentado à total ausência de pigmento) (Figura 5).

Os dados foram ordenados e agrupados utilizando a ferramenta de planilha dinâmica do programa Excel 2010 para em seguida serem exportados para o programa STATISTICA, v. 7 (Statsoft Inc.) que foi utilizado para as análises estatísticas.

Na avaliação da variação do padrão de pigmentação ao longo da costa, foi realizada a distribuição de frequências dos 5 padrões de pigmentação ocular para cada

localidade através de histogramas de frequências e avaliado o ajuste à distribuição normal pelo teste Kolmogorov-Smirnov, com 5% de significância. Foram obtidas as frequências de cada padrão e a comparação entre localidades foi realizada através de análises não paramétricas. O teste Chi-quadrado com tabela de contingência (Zar, 1984) foi aplicado para testar a hipótese nula, que as frequências dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode são independentes da praia da qual provêm. Se isto for verdade, se espera encontrar padrões semelhantes entre as praias. O valor calculado do Chi-quadrado (χ^2) é obtido de $\chi^2 = \sum[(O-E)^2/E]$, onde O e E representam as frequências observadas e esperadas dos padrões de pigmentação dos olhos, respectivamente; e os graus de liberdade (gl) são calculados por $gl = (R-1)(P-1)$, onde R representa os padrões de pigmentação, e o P o número de praias avaliadas na tabela de contingência. Desta forma, foram realizados os testes com tabela de contingência entre todas as praias e entre praias vizinhas.

A análise temporal, por ano e estação para as localidades de Cabiúnas e Comprida seguiu as mesmas análises estatísticas que foram utilizadas para a avaliação ao longo da costa. No entanto, também foram obtidas as porcentagens de juvenis, fêmeas ovadas e machos, para ambas as localidades e sua distribuição nas diferentes estações dos anos estudados. Assim, foi também avaliada a frequência dos padrões de pigmentação por gênero e etapa de desenvolvimento. Foi utilizado um teste-t para avaliar as diferenças das frequências dos padrões 0 e 4 entre populações e para ambos os sexos.

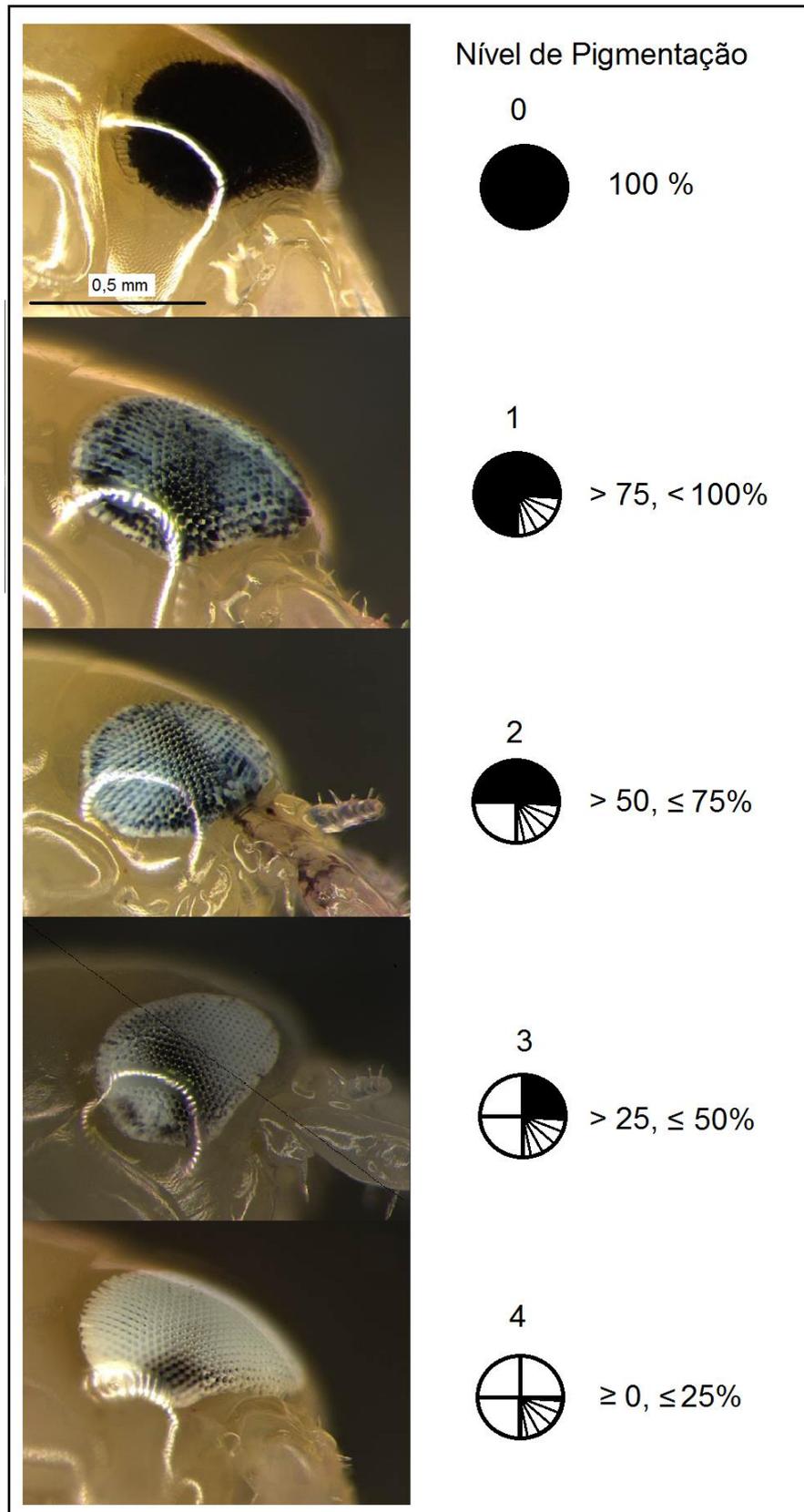


Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de omatídeos pigmentados e não pigmentados e os respectivos padrões de pigmentação encontrados em *A. brasiliensis*: 0 (100% pigmentado de preto); 1 (< 100%, ≥ 75% pigmentado); 2 (< 75%, ≥ 50% pigmentado); 3 (< 50%, ≥ 25% pigmentado); 4 (<25% pigmentado à total ausência de pigmento).

2.3.3 Radiação UV-B incidente no período estudado e sua correlação com a frequência dos padrões de pigmentação do olho de *A. brasiliensis*.

Os valores do Índice Ultra Violeta (IUV) foram obtidos para o período em que foram realizadas as coletas de anfípodes através do site do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), divisão de satélites e sistemas ambientais (DAS) (<http://satelite.cptec.inpe.br/>). Com o objetivo de avaliar a possível correlação entre os padrões de pigmentação do olho dos anfípodes e a incidência de UV, foram calculadas as médias e máximas da radiação para o período estudado. O Índice Ultravioleta varia de 0 à 15 e representa a energia acumulada em uma hora de exposição, em centijoules por centímetro quadrado. (Kirchhoff, 1995).

Foi realizada a correlação de Spearman entre os valores do IUV e a frequência dos padrões de pigmentação do olho encontrados nas praias de Cabiúnas e Comprida para o período estudado.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Frequência dos padrões de pigmentação no olho dos anfípodes ao longo da costa no estado de Rio de Janeiro

A distribuição de frequências dos padrões de pigmentação dos olhos nas dez praias analisadas para o verão de 2015 são apresentadas na Figura 6. Os dados não se ajustaram à distribuição normal ($D= 0,3864$; $p < 0,01$), o que também pode ser constatado quando analisado por praia (ver Anexo 1). A porcentagem das frequências dos padrões de pigmentação de *A. brasiliensis* variou bastante entre as dez praias estudadas (Tabela 3).

A frequência dos padrões de pigmentação ao longo do gradiente geográfico para o verão de 2015, não apresentou nenhum padrão definido. Entre todas as praias, a praia Rasa foi a única que apresentou maior porcentagem do padrão 4. A praia Campista apresentou maior porcentagem do padrão 3. As praias de Carapebus e do Barreto apresentaram-se com diferentes níveis de pigmentação e ainda tendo maior porcentagem do padrão 0, este não ultrapassou os 50%. As outras praias (João Francisco, Comprida, Cabiúnas, Francês e Cavaleiros) mostraram predominantemente o padrão 0, com mais

de 50% dos indivíduos, sendo que na praia de Mar do Norte, todos os anfípodes apresentaram o padrão 0 para esse ano (Tabela 3; Figura 7). Corroborando com as porcentagens dos padrões de pigmentação encontrados, apenas na praia Campista (padrão 3) e na praia Rasa (padrão 4) os olhos com menor pigmentação foram os predominantes na comparação entre populações vizinhas, sendo para todas as outras praias o padrão 0 (100% pigmentado), o mais frequente (Tabela 3) para o verão de 2015.

Ao compararmos as frequências dos padrões de pigmentação entre todas as praias, constatou-se que os padrões encontrados dependem da localidade da qual os anfípodes provêm, rejeitando assim a hipótese nula (H_0) da independência dos padrões de pigmentação da localidade ($\chi^2_c = 299,5$; $\chi^2_t = 67,985$; $gl = 36$; $p = 0,001$) (Anexo 2).

Quando comparadas as frequências dos padrões de pigmentação entre praias vizinhas, também rejeitamos a hipótese nula (H_0), comprovando que há diferenças significativas entre as populações das diferentes localidades no que se refere a padrão de pigmentação. Entre praias vizinhas com o padrão de pigmentação 0, praticamente para todas as relações foram encontradas diferenças significativas com exceção apenas entre as vizinhas Barreto e Campista, e Cavaleiros e Mar do Norte. Em relação as praias vizinhas com padrão de pigmentação 4, metade das relações entre as vizinhas foram significativas e outra metade não, destacando-se novamente as vizinhas; Barreto e Campista, e Cavaleiros e Mar do Norte que não apresentaram diferenças significativas (Tabela 4).

Podemos observar que o número de anfípodes identificados com o padrão de pigmentação 0, prevaleceu aos outros padrões, em juvenis e em ambos os sexos (Figura 8). Quando divididos em 4 classes de tamanhos, conseguimos observar que 87% dos anfípodes com tamanhos menores ou iguais a 6,02 mm, apresentavam o padrão 0, e que ao aumentarem de tamanho os padrões menos pigmentados começam a se fazer mais presentes. Entre os anfípodes maiores que 11,3 mm o padrão 4, é que apresenta a maior proporção atingindo 50% dos indivíduos (Figura 9).

As análises comparativas entre as quatro classes de tamanho vizinhas para o padrão de pigmentação 0, não distinguindo-se as praias, mostrou-nos que houve diferenças significativas ($p < 0,0000$) entre as classes subsequentes, indicando que a frequência do padrão 0 difere significativamente entre as classes (Tabela 5).

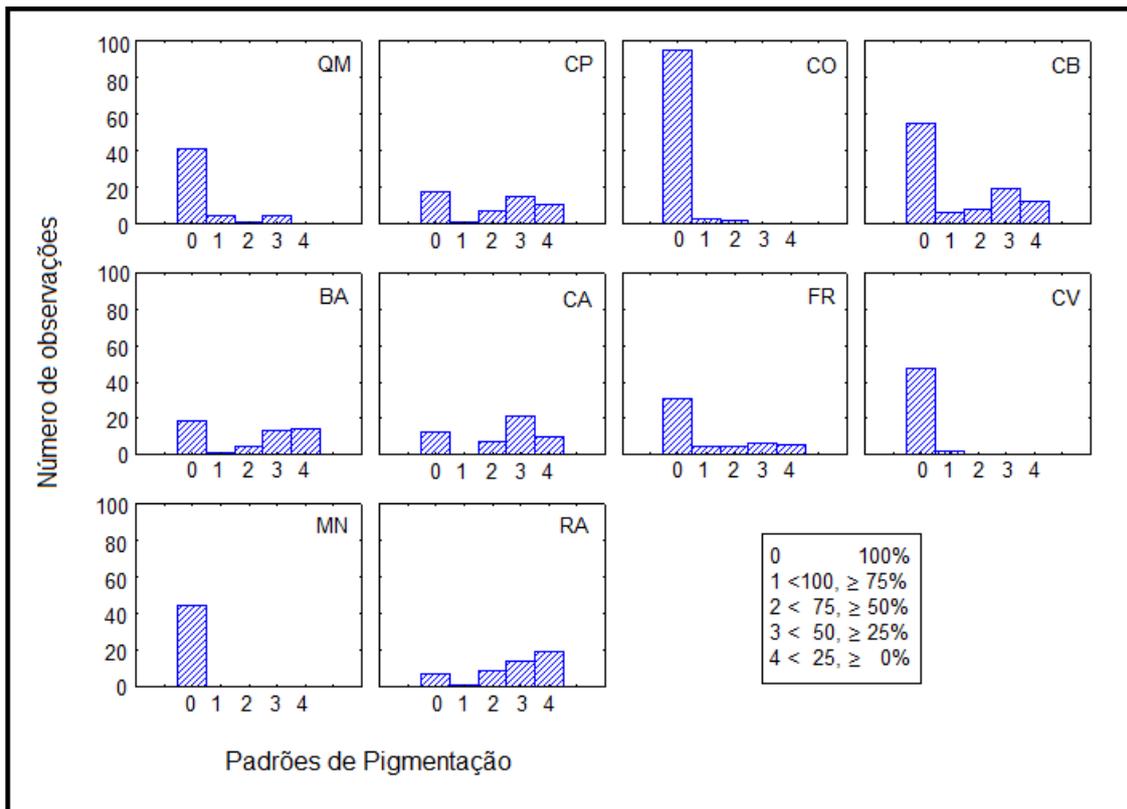


Figura 6. Histogramas da distribuição das frequências dos padrões de pigmentação dos olhos em *A. brasiliensis* nas dez praias do Norte-Fluminense e Região dos Lagos. (QM) praia de João Francisco; (CP) praia de Carapebus; (CO) praia Comprida; (CB) praia de Cabiúnas; (BA) praia do Barreto; (FR) praia do Francês, Arquipélago de Sant'Anna; (CA) praia Campista; (CV) praia de Cavaleiros; (MN) praia de Mar do Norte; (RA) praia Rasa.

Tabela 3. Frequência dos padrões de pigmentação dos olhos em *A. brasiliensis* no verão de 2015.

Padrões	Frequência dos padrões de pigmentação dos olhos (%)				
	0 (100%)	1 (< 100%, ≥ 75%)	2 (< 75%, ≥ 50%)	3 (< 50%, ≥ 25%)	4 (< 25%; 0)
Praia					
João Francisco	82	8	2	8	0
Carapebus	34	2	14	30	20
Comprida	95	3	2	0	0
Cabiúnas	55	6	8	19	12
Barreto	36	2	8	19	12
Francês	62	8	8	12	10
Campista	24	0	14	42	20
Cavaleiros	96	4	0	0	0
Mar do Norte	100	0	0	0	0
Rasa	14	2	18	28	38

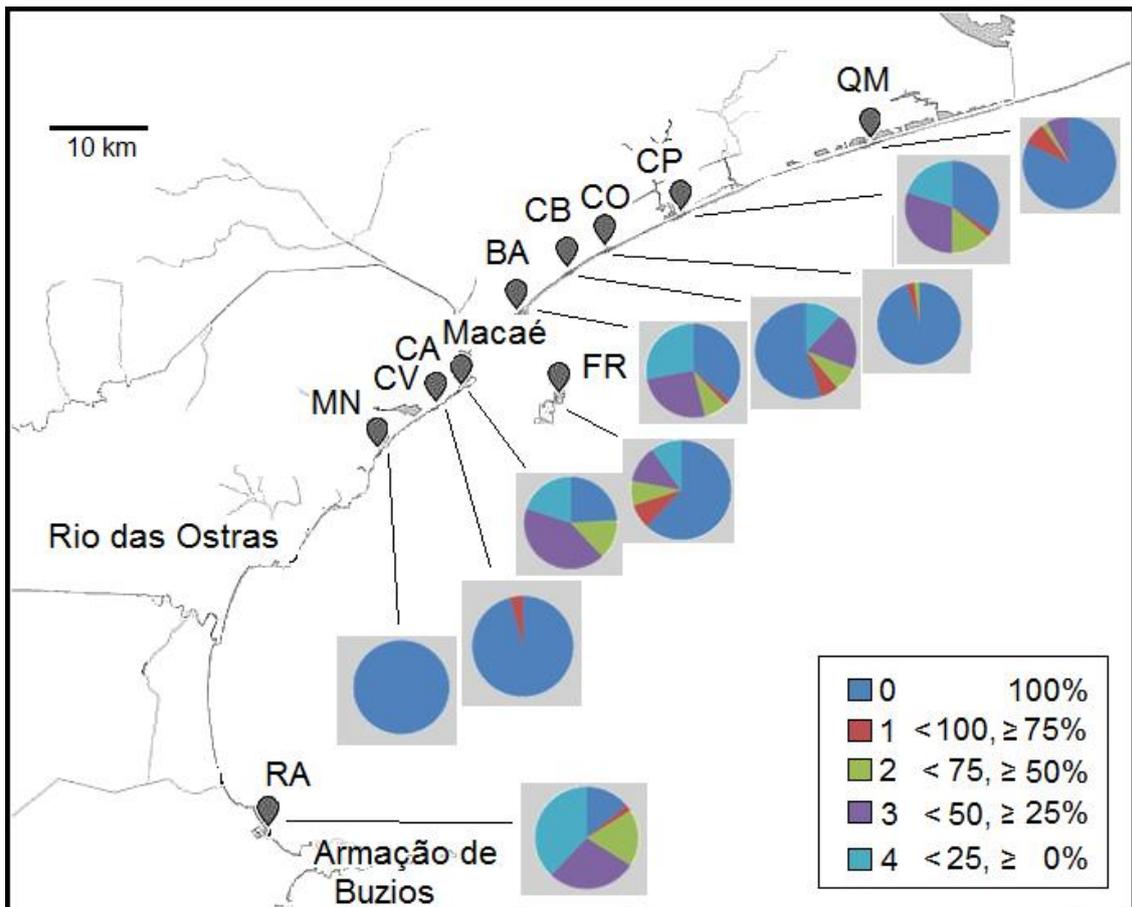


Figura 7. Frequência (%) dos padrões de pigmentação nos olhos de *A. brasiliensis*. (QM) praia de João Francisco; (CP) praia de Carapebus; (CO) praia Comprida; (CB) praia de Cabiúnas; (BA) praia do Barreto; (FR) praia do Francês, Arquipélago de Sant'Anna; (CA) praia Campista; (CV) praia de Cavaleiros; (MN) praia de Mar do Norte; (RA) praia Rasa.

Tabela 4. Resultados da comparação da frequência dos padrões de pigmentação entre populações vizinhas de *A.brasiliensis*. Valor calculado de qui quadrado (χ^2_c) comparado com o valor tabelado ($\chi^2_{t(4; 0,001)}$).

Praias	Tabela de contingencia		Teste t	
	χ^2_c	<i>p</i>	p (padrão 0)	p (padrão 4)
João Francisco & Carapebus	52,9	<i>p</i> < 0,001	p < 0,0001	p < 0,0012
Carapebus & Comprida	59,3	<i>p</i> < 0,001	p < 0,0001	p < 0,00001
Comprida & Cabiúnas	80,7	<i>p</i> < 0,001	p < 0,0001	p < 0,0004
Cabiúnas & Barreto	62,7	<i>p</i> < 0,001	p < 0,0297	p = 1,0000
Barreto & Francês	24,21	<i>p</i> < 0,001	p < 0,0107	p < 0,7500
Francês & Campista	46,1	<i>p</i> < 0,001	p < 0,0002	p < 0,1646
Barreto & Campista	64,1	<i>p</i> < 0,001	p < 0,1935	p < 0,2779
Campista & Cavaleiros	69,3	<i>p</i> < 0,001	p < 0,00001	p < 0,0012
Cavaleiros & Mar do Norte	53,2	<i>p</i> < 0,001	p < 0,1832	P = 1,0000
Mar do Norte & Rasa	89,7	<i>p</i> < 0,001	p < 0,00001	p < 0,00001

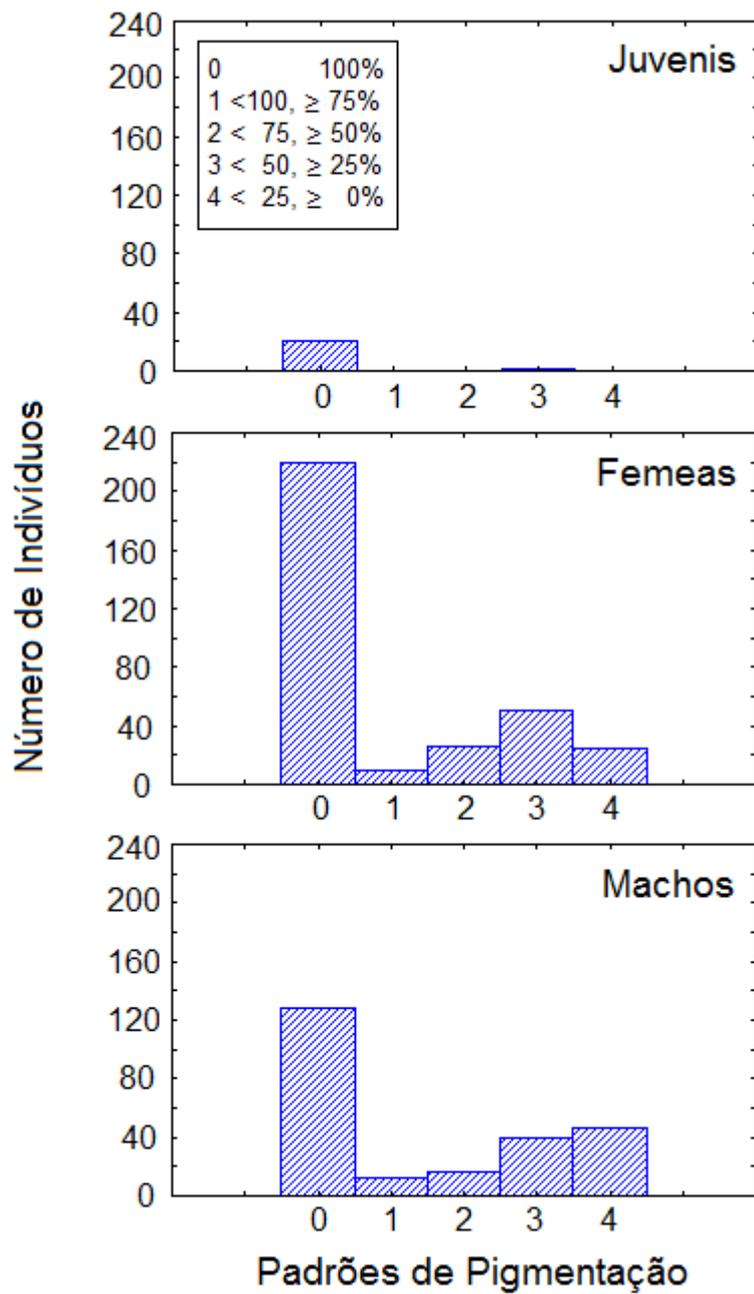


Figura 8. Histogramas da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação dos olhos encontrados para juvenis, fêmeas e machos de *A. brasiliensis*.

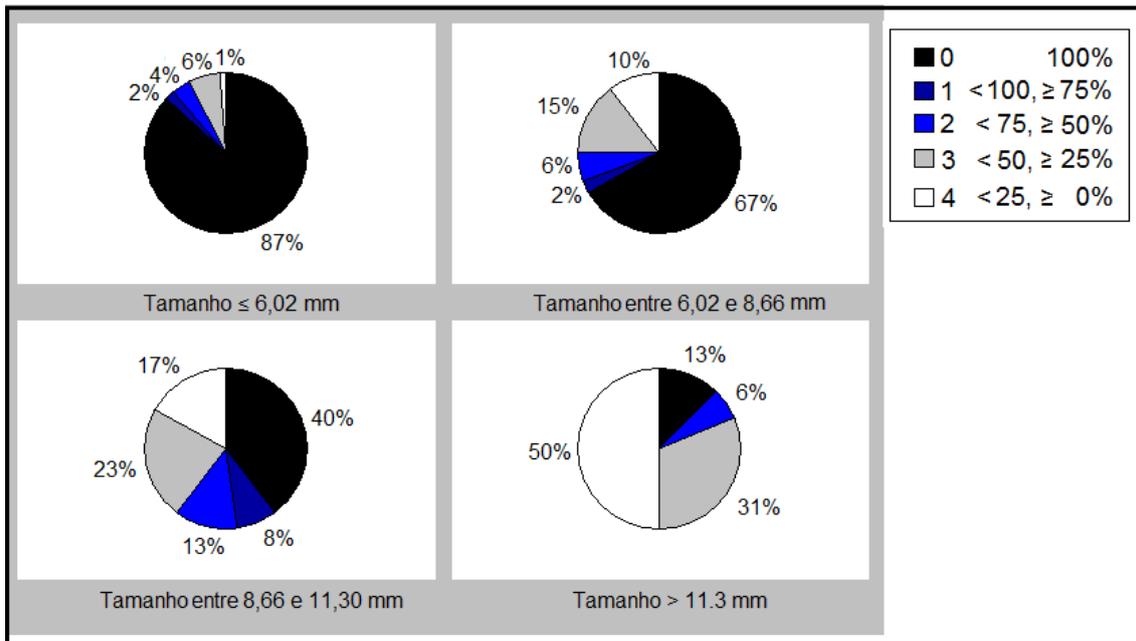


Figura 9. Frequência relativa dos padrões de pigmentação encontrados em cada uma das quatro classes de tamanho de *A. brasiliensis*, no verão de 2015 nas dez praias estudadas.

Tabela 5. Comparação das frequências dos padrões de pigmentação 0 em *A. brasiliensis* entre as quatro classes de tamanho.

Classe Tamanho (mm)	Quantidade de indivíduos	% Padrão 0	Comparação com a classe anterior pelo teste t <i>p</i>
<6,02	159	87	
6,02 a 8,66	244	67	<0,0000
8,66 a 11,3	159	40	<0,0000
> 11,3	32	13	0,0040

2.4.2 Frequência dos padrões de pigmentação dos olhos entre as praias de Cabiúnas e Comprida do PARNA.

Um total de 2123 anfípodas foram obtidos das coletas realizadas em 2012, 2014 e 2015. Durante o período de estudo, ambas as populações apresentaram maior proporção de fêmeas (> 55%) que de machos (Tabela 6). Na praia Comprida as maiores porcentagens de fêmeas ovadas foram observadas no outono de 2012, inverno de 2014 e outono de 2015, e na praia de Cabiúnas foram encontradas no inverno de 2012 e 2014, e em outono de 2015 (Figuras 10 a, b).

Em ambas as praias (Cabiúnas e Comprida) foram encontrados anfípodas com os cinco padrões de pigmentação (0-4), sendo para ambas as praias os padrões 0 e 4, os mais frequentes, contudo, o padrão 0 foi o que predominou durante o período avaliado (Figura 11). Os níveis de pigmentação dos olhos compostos encontrados nos anfípodas para ambas as praias não apresentaram uma distribuição normal.

Sem separar os anfípodas por ano podemos observar que em ambas as praias, o padrão 0 foi predominante entre os juvenis, e manteve sua predominância entre as fêmeas. Os machos da praia de Cabiúnas apresentaram predominância do padrão 4 enquanto na praia Comprida ambos padrões 0 e 4 foram os mais frequentes (Figura 12). Quando comparamos através do teste t as frequências do padrão de pigmentação mais encontrado (0), observamos que a frequência dos padrões de pigmentação nos juvenis não difere entre as praias ($p = 0,8942$, Tabela 7). No entanto, todas as outras comparações mostraram diferenças significativas: entre os sexos da mesma praia, dentro do mesmo sexo entre as praias, e entre juvenis e adultos (Tabela 7). De maneira geral levando em consideração apenas a variação dos padrões ao longo dos anos, em ambas as praias podemos observar o predomínio do padrão 0 em 2012, do padrão 4 em 2014, e um ligeiro predomínio do padrão 0 em 2015. Foi observado na primavera de 2014 que os padrões de pigmentação para ambas as praias oscilaram entre 3 e 4, que com a chegada do verão de 2015, o padrão 0, passou a ser o predominante (Figura 13). Ao compararmos os dois padrões mais encontrados (0 e 4), entre as praias para os diferentes anos, observou-se que os anfípodas não mostraram diferenças significativas entre elas para nenhum dos padrões analisados (0 e 4) para os anos de 2012 e 2014 (Tabela 8). No entanto, para 2015 e entre os anos dentro de cada praia, praticamente todas as diferenças foram significativas (teste t; $p < 0,05$). Os anfípodas da praia de

Cabiúnas não apresentaram diferenças significativas na frequência do padrão 0, entre os anos de 2012 e 2015 (teste t; $p = 0,6737$) (Tabela 8).

Ainda comparando as praias para os dois padrões mais encontrados por estação nos anos estudados, observamos diferenças significativas entre elas para o padrão 0 no outono, inverno e primavera de 2012; e para o padrão 4, na primavera e inverno de 2012 (Tabela 9). No ano de 2014, não houve diferenças significativas entre Cabiúnas e Comprida em nenhuma estação para nenhum dos dois padrões de pigmentação avaliados (Tabela 9). Quando não foi feita distinção entre os anos de 2012 e 2014, apenas primavera mostra diferenças significativas entre as praias para os padrões 0 e 4 (Tabela 10).

Também observamos que nos anos de 2014 e 2015, o padrão de pigmentação 0 foi o mais presente entre os juvenis ($<4,08$ mm), e que com a transição da fase juvenil para a fase adulta, com o aumento de tamanho, há uma diminuição do padrão 0 e aumento dos padrões 3 e 4. Entre os anfípodes das classes de tamanho maiores que 7,84 mm o padrão 0 começa a ser encontrado em menos de 50% dos indivíduos, e os padrões 3 e 4 começam a ser os mais encontrados dividindo os outros 50%. Nitidamente, observamos que há um aumento dos padrões de pigmentação 3 e 4 com o aumento de tamanho (Figura 14) (ver anexos 3 e 4).

Tabela 6. Frequência relativa de juvenis, fêmeas e machos do anfípode *A. brasiliensis* nas praias de Cabiúnas e Comprida entre 2012 e 2015 com exceção de 2013.

	COMPRIDA			CABIÚNAS		
	Juvenis	Fêmeas	Machos	Juvenis	Fêmeas	Machos
2012	15,9	66,4	17,7	9,2	68,7	22,1
2014	3,9	63,5	32,6	4,7	65,0	30,3
2015	6,0	65,0	29,0	1,5	55,0	43,5

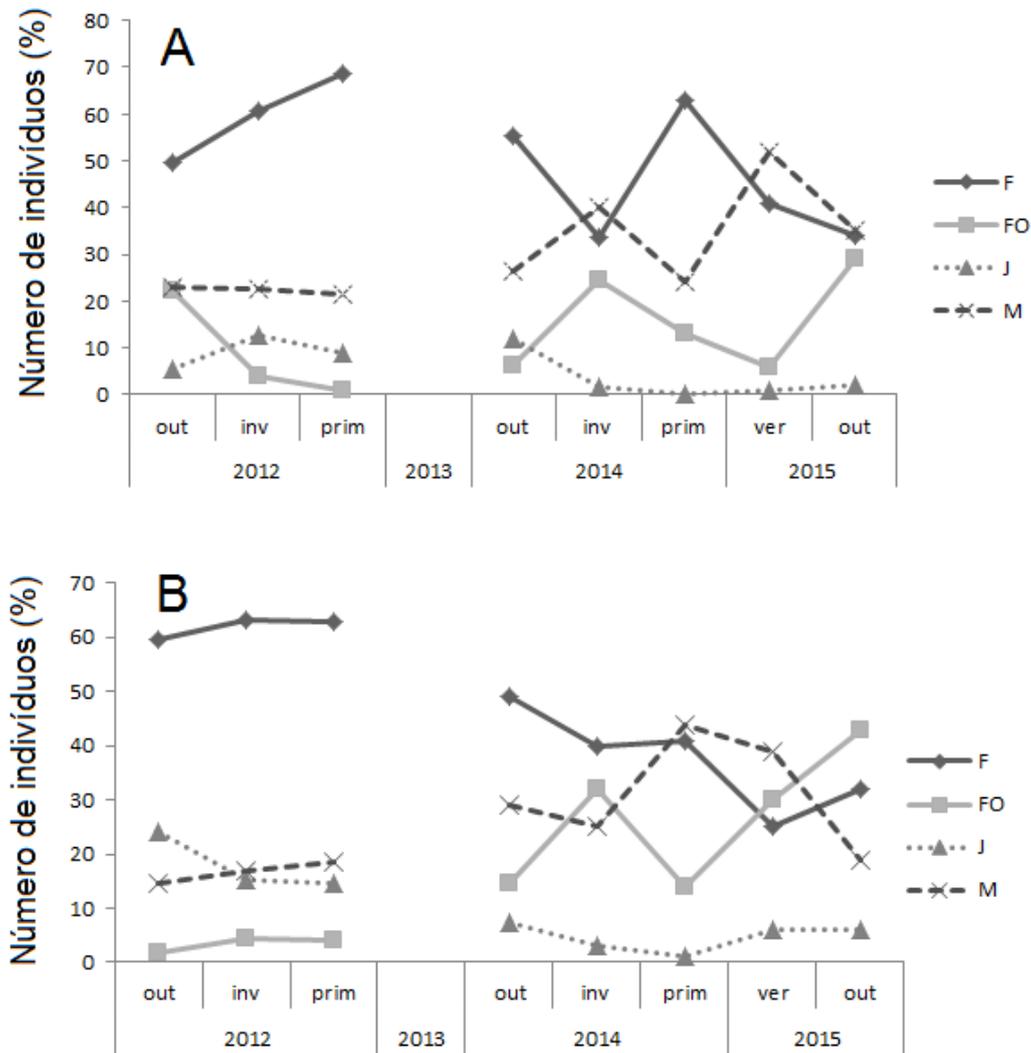


Figura 10. Variação da frequência do anfípode *A. brasiliensis* coletado nas praias Comprida (A) e Cabiúnas (B) entre 2012 e 2015, com exceção de 2013. (J) juvenis; (F) fêmeas; (FO) fêmeas ovígeras; (M) machos.

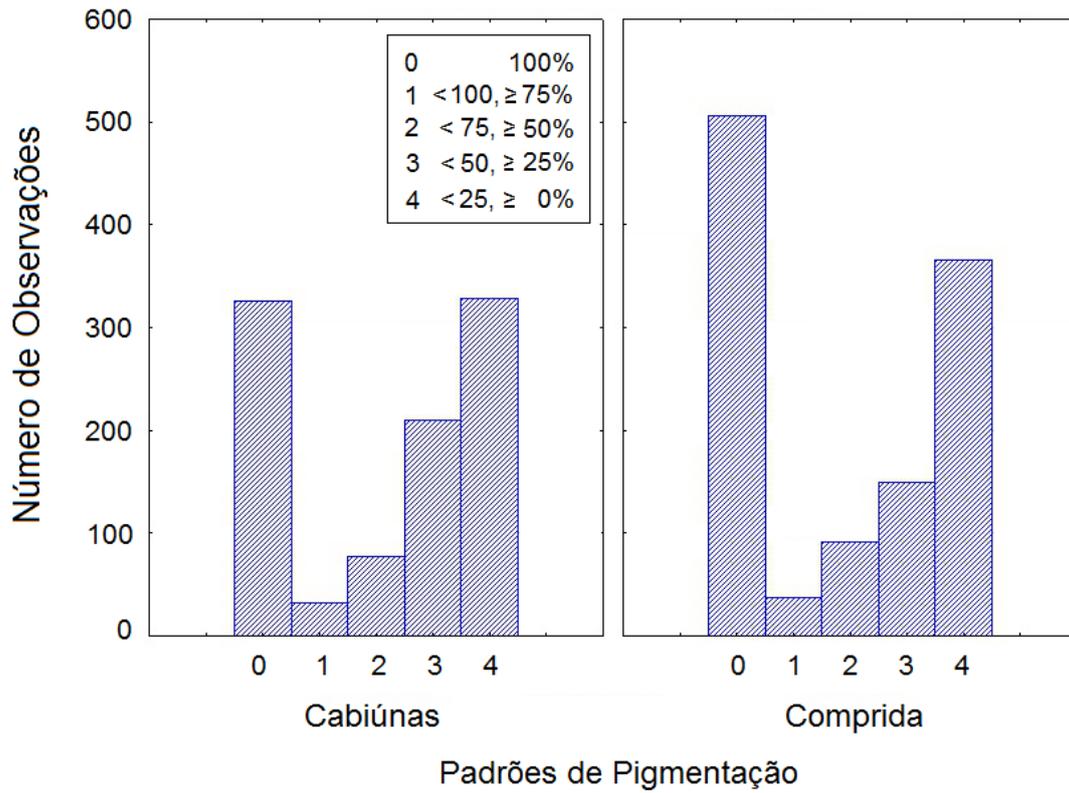


Figura 11. Histogramas da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação nos olhos do anfípode *A. brasiliensis* nas praias de Cabiúnas e Comprida nos anos 2012, 2014 e 2015.

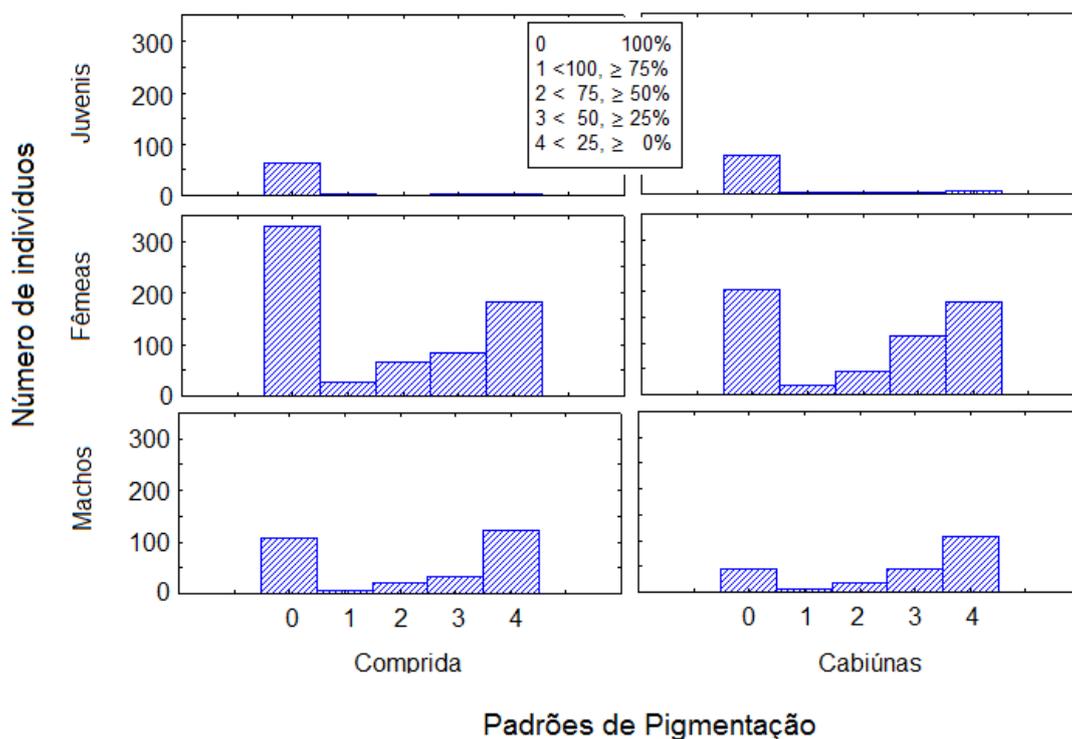


Figura 12. Histogramas da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação observados na praia de Cabiúnas e Comprida, para juvenis, fêmeas e machos do anfípode *A. brasiliensis*, para todo o período amostrado (2012, 2014 e 2015).

Tabela 7. Resultados do teste *t* da comparação da frequência do padrão de pigmentação 0 entre os sexos para cada praia, e entre praias para um mesmo sexo, e entre juvenis e adultos,.

Praias	N	Teste <i>t-student</i>	
		% padrão 0	(p)
J _{CAB} & J _{COM}	92	81,6	0,8942
F _{CAB} & F _{COM}	560	36,4	< 0,0000
M _{CAB} & M _{COM}	222	20,7	0,0001
F _{CAB} & M _{CAB}	560	36,4	< 0,0000
F _{COM} & M _{COM}	687	48,0	0,0020
J _{CAB} & A _{CAB}	92	81,6	< 0,0000
J _{COM} & A _{COM}	74	82,4	< 0,0000
	975	44,8	

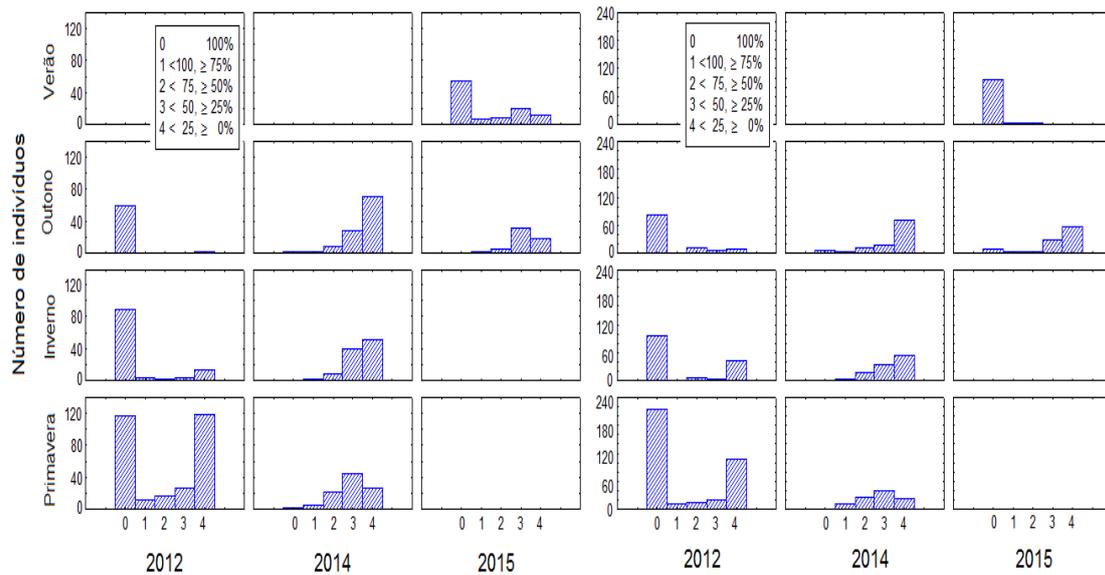


Figura 13. Histograma da distribuição de frequências dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode *A. brasiliensis* nas praias de Cabiúnas e Comprida.

Tabela 8. Resultados do teste *t* da comparação da frequência dos padrões de pigmentação 0 e 4 do anfípode *A. brasiliensis* entre as praias de Cabiúnas e Comprida para cada ano e entre os anos para cada praia.

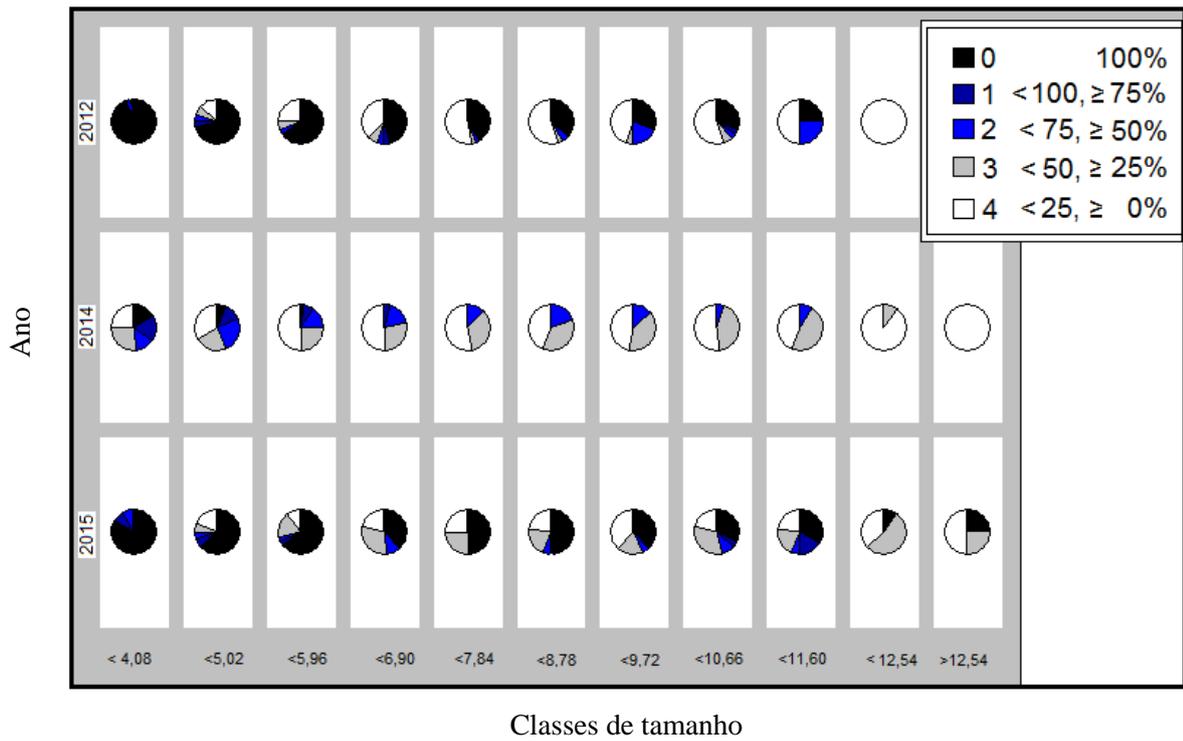
Comparação	Teste <i>t-student</i>				
	N	% padrão 0	p	% padrão 4	p
2012 _{CAB} & 2012 _{COM}	464	57,3	0,0663	28,9	0,2248
2014 _{CAB} & 2014 _{COM}	1,3	310	0,2716	47,7	0,7250
2015 _{CAB} & 2015 _{COM}	100	55	< 0,0000	12	0,0004
2012 _{CAB} & 2014 _{CAB}	464	57,3	< 0,0000	28,9	< 0,0000
2012 _{CAB} & 2015 _{CAB}	464	57,3	0,6737	28,9	0,0005
2014 _{CAB} & 2015 _{CAB}	310	1,3	< 0,0000	47,7	< 0,0000
2012 _{COM} & 2014 _{COM}	629	62,8	< 0,0000	25,6	< 0,0000
2012 _{COM} & 2015 _{COM}	629	62,8	< 0,0000	25,6	< 0,0000
2014 _{COM} & 2015 _{COM}	320	2,5	< 0,0000	46,3	< 0,0000

Tabela 9. Resultados do teste *t* na comparação das praias para a frequência dos padrões de pigmentação 0 e 4 do anfípode *A. brasiliensis*, durante as estações dos anos de 2012 e 2014.

	Comparação	Teste <i>t</i>				
		N	% padrão 0	p	% padrão 4	p
2012	Out _{CAB} &	62	96,8	0,0004	3,2	0,1
	Out _{COM}	109	75,2		9,2	
2012	Inv _{CAB} &	112	79,5	0,0095	12,5	0,0019
	Inv _{COM}	150	64,7		28,7	
2012	Prim _{CAB} &	290	40,3	< 0,0000	40,7	0,0021
	Prim _{COM}	370	58,4		29,2	
2014	Out _{CAB} &	110	1,8	0,1448	64,5	1,000
	Out _{COM}	110	5,5		64,5	
2014	Inv _{CAB} &	100	1,0	0,9405	51,0	0,8850
	Inv _{COM}	110	0,9		50,0	
2014	Prim _{CAB} &	100	2,0	0,5614	26,0	0,5086
	Prim _{COM}	100	1,0		22,0	

Tabela 10. Resultados do teste *t* realizado para comparar as frequências dos padrões de pigmentação 0 e 4 do anfípode *A. brasiliensis*, entre as praias para as estações sem distinção entre os anos de 2012 e 2014.

Comparação	Teste <i>t</i>				
	N	% padrão 0	p	% padrão 4	p
Out _{CAB} &	172	36,0	0,3971	42,4	0,2787
Out _{CO}	219	40,2		37,0	
Inv _{CAB} &	212	42,0	0,3426	30,6	0,1072
Inv _{CO}	260	37,7		37,7	
Prim _{CAB} &	390	30,5	< 0,0000	36,9	0,0036
Prim _{CO}	470	46,2		27,6	



Classes de tamanho

Figura 14. Frequência anual dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode *A. brasiliensis* na praias de Cabiúnas e Comprida por classes de tamanho.

2.4.3. Radiação UV-B incidente durante o período estudado e correlação com a frequência dos padrões de pigmentação dos olhos do anfípode *A. brasiliensis*

Os valores médios e as máximas de IUV calculados se encontram representados na parte superior da Figura 15. Os menores valores são observados no inverno, e os maiores são observados em primavera e verão, e de acordo com o observado em 2015, os valores de verão ainda são superiores aos da primavera.

A frequência do nível de pigmento nos olhos de *A. brasiliensis* apresentou oscilações entre as diferentes estações durante todo o período de estudo. Em 2012, houve um aumento da frequência dos padrões 1, 2, 3 e principalmente do 4, com diminuição da frequência do padrão 0, no período compreendido entre o outono e a primavera. Em 2014, o padrão mais observado no outono foi o 4, diminuindo gradativamente até a primavera, e paralelamente os padrões 3 e 2 aumentaram do outono à primavera, e os padrões 0 e 1 sofreram pequenas variações no mesmo período. O único verão amostrado foi o de 2015 apresentando a maior frequência de anfípodas com o padrão 0. No outono porém o padrão 0 diminuiu drasticamente, e em contrapartida os dois padrões com menos pigmentos (3 e 4), aumentaram consideravelmente (Figura 15).

De acordo com os resultados da correlação de Spearman, não se observou correlação entre as variações de IUV e as variações dos padrões 0 e 4 de pigmentação dos olhos dos anfípodas. A diminuição da frequência do padrão 0, parece acompanhar a redução da radiação IUV após a alta incidência do verão, esta diminuição do padrão 0 continua, em quanto as radiações voltam a aumentar. Essa tendência não ocorreu em 2014, quando os padrões foram completamente diferente de 2012 e 2015, o que também contribuiu à falta de correlação com a IUV (Anexo 5).

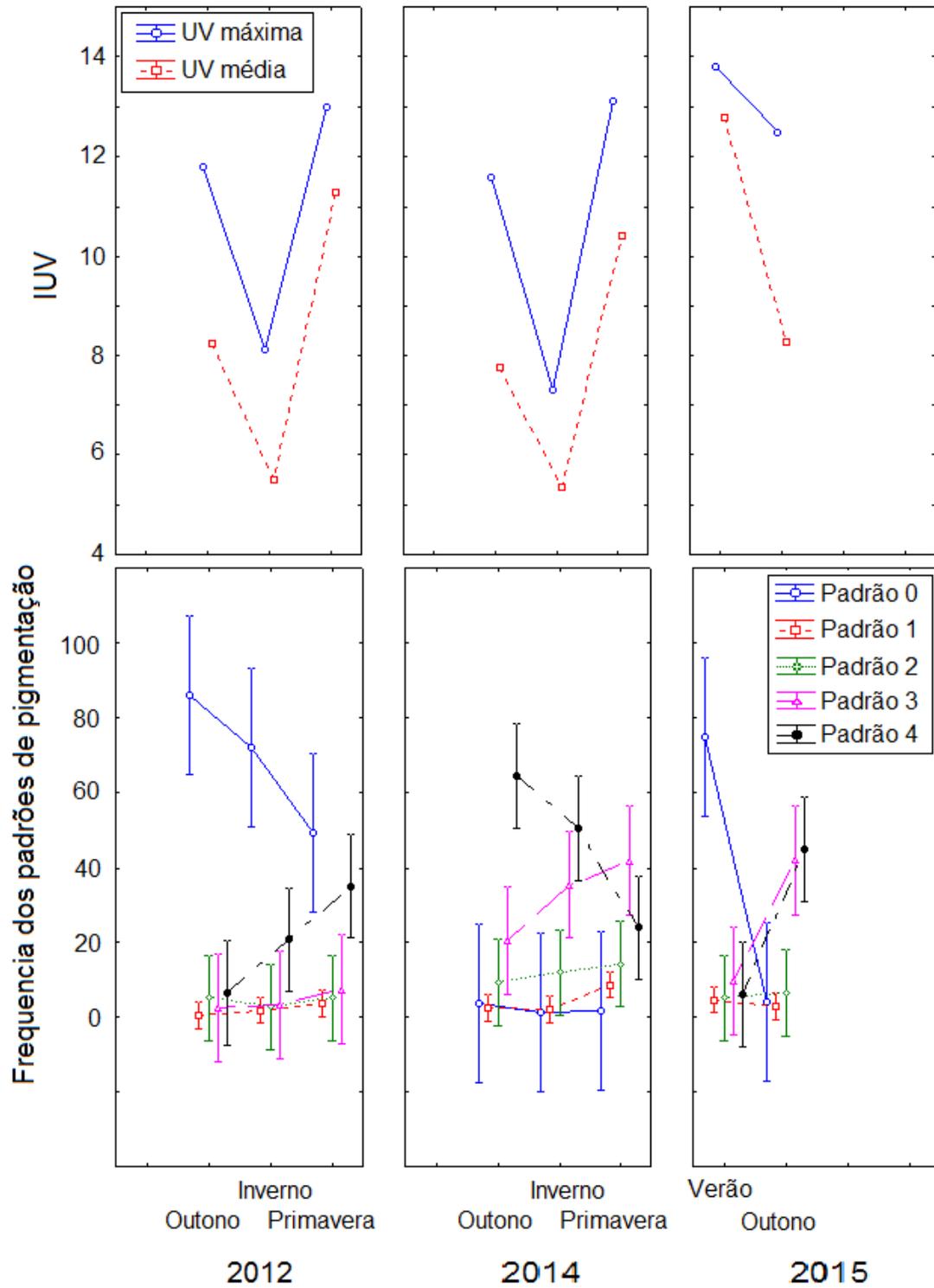


Figura 15. Frequência sazonal dos padrões de pigmentação do anfípode *A. brasiliensis* nos anos de 2012, 2014 e 2015, e a variação média e máxima do Índice Ultra Violeta para as mesmas estações e anos.

3. ESTUDOS DA ALTERAÇÃO INDIVIDUAL DO PADRÃO DE PIGMENTAÇÃO DO OLHO COMPOSTO DO ANFÍPODE A. *BRASILIENSIS* ATRAVÉS DE BIOENSAIOS

3.1 INTRODUÇÃO

Sabe-se bem que os talitrídeos utilizam-se da visão para detectar os diferentes comprimentos de onda dos astros (sol e lua) para orientar-se no eixo entre a terra e o mar nas praias arenosas (Scapini, 2006; Scapini e Dugan, 2008; Mezzetti et al., 2010a). Outros grupos de anfípodes utilizam-se da visão para diferentes funções em diferentes habitats, desde ambientes com baixa disponibilidade de luz no fundo dos oceanos à ambientes terrestres. Esta capacidade de detecção de diferentes comprimentos de onda pelos olhos destes animais certamente desperta o interesse da comunidade científica que tem estudado os aspectos fisiológicos, morfológicos e comportamentais decorrentes da vasta diversificação dos olhos nesta ordem. A fisiologia visual tem sido estudada em diferentes espécies de anfípodes que habitam os mais diversos ecossistemas. Cohen e Frank (2006) debruçaram-se sobre os aspectos fisiológicos envolvidos na captura de fótons por *Abyssorchomene plebs* (Gammaridea: Lysianassoidea) em ambientes com pouca luz e observaram que este animal apresenta sensibilidade espectral máxima de 487 nm, na faixa espectral que abrange os comprimentos de ondas azuis. Mezzetti et.al. (2010b) reportaram diferenças nas estruturas morfológicas dos olhos entre *Talorchestia spinifera* e *Talitrus saltator* que podem estar relacionadas aos diferentes habitats e como os olhos são utilizados na orientação. Destaca-se neste contexto a capacidade de *Talitrus saltator* em detectar comprimentos de onda entre 404 - 506 nm na região espectral do azul considerado como representando a direção do “mar” (Ugolini et al. 2009). Assim, os espectros de resposta e sensibilidade a diferentes comprimentos de onda, tem revelado a presença de rodopsina no rabdoma, e pigmentos diversos de azul/verde nas células da retina (Cohen et al., 2010) e especula que a quinta célula retinal (R5), amorfa, possa ser sensível a luz UV, podendo ter uma função de detecção de luz polarizada (Hallberg e Nilson, et al. 1980).

Os bioensaios em laboratório são importantes ferramentas a favor da pesquisa científica, pois possibilitam ao pesquisador isolar fatores que no ambiente natural não

teriam como ser separados. Através de bioensaios em laboratório fatores como umidade, temperatura, salinidade, entre outros podem ser controlados, de tal maneira que o bem estar animal seja mantido. A extensão do período de aclimação permite a estabilização fisiológica do organismo. Algumas desvantagens em se realizar tais experimentos em laboratório, podem ser apontadas como estresse dos animais e a dificuldade de manutenção dos mesmos. O anfípode talitrídeo *A. brasiliensis* por se tratar de um crustáceo semi-terrestre requer atenção redobrada aos fatores necessários a sua manutenção saudável, tais como, umidade, temperatura e salinidade.

Apesar de praticamente não haver trabalhos com biosensaios utilizando *A. brasiliensis*, outros anfípodas da família Talitridae encontrados no hemisfério Norte, especificamente na Europa como *Talitrus Saltator* e *Orchestoidea tuberculata*, também semi-terrestres tem sido amplamente utilizados em experimentos de orientação em relação à luminosidade controlada em laboratório, quanto à orientação em relação aos astros no ambiente natural, sendo mantidos em laboratório por períodos de 7 à 14 dias (Scapini and Dugan 2008; Ugolini 2014).

3.2 OBJETIVOS

- Determinar através de bioensaios se há mudança de padrão de pigmentação em indivíduos de *A. brasiliensis*, submetidos a diferentes condições ambientais (radiação UV, e substrato).
- Determinar se a exposição a diferentes graus de incidência luminosa podem alterar o padrão de pigmentação observado num indivíduo de *A. brasiliensis*.
- Determinar se a radiação UV pode causar alteração do padrão de pigmentação individual do olho no anfípode *A. brasiliensis*.
- Determinar se a alteração da cor do substrato pode alterar o padrão individual de pigmentação do olho no anfípode *A. brasiliensis*.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Padronização das condições ideais de manutenção do anfípode *A. brasiliensis* em laboratório

3.3.1.1 Bioensaio 1

A coleta dos anfípodes foi realizada na praia do Barreto, no mesmo ponto descrito na Tabela 1, e seguindo a mesma metodologia descrita no ponto 2.3.1, no entanto contendo as “pit-falls” aproximadamente 3 ml de água do mar. Os anfípodes capturados eram rapidamente retirados com o auxílio de um puçá, e armazenados em uma caixa térmica contendo areia úmida e levados ao laboratório.

Foram utilizados 150 anfípodes, que foram divididos em três grupos. Cada anfípode foi colocado em um béquer plástico de 50 mL contendo papel filtro umidificado com água do mar coletada na própria praia (Figura 16). Foram acondicionados em incubadora a $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12h de incidência luminosa e 12h em escuridão. Cada grupo foi colocado em uma prateleira da incubadora (Figura 17). A cada 4h os recipientes eram umidificados com auxílio de uma pipeta com água do mar com salinidade de 36 ppt.



Figura 16. Béqueres de plástico preparados para acondicionarr os anfípodes antes de serem submetidos à incubadora, contendo papel filtro no fundo, e coberta por (0,5mm).

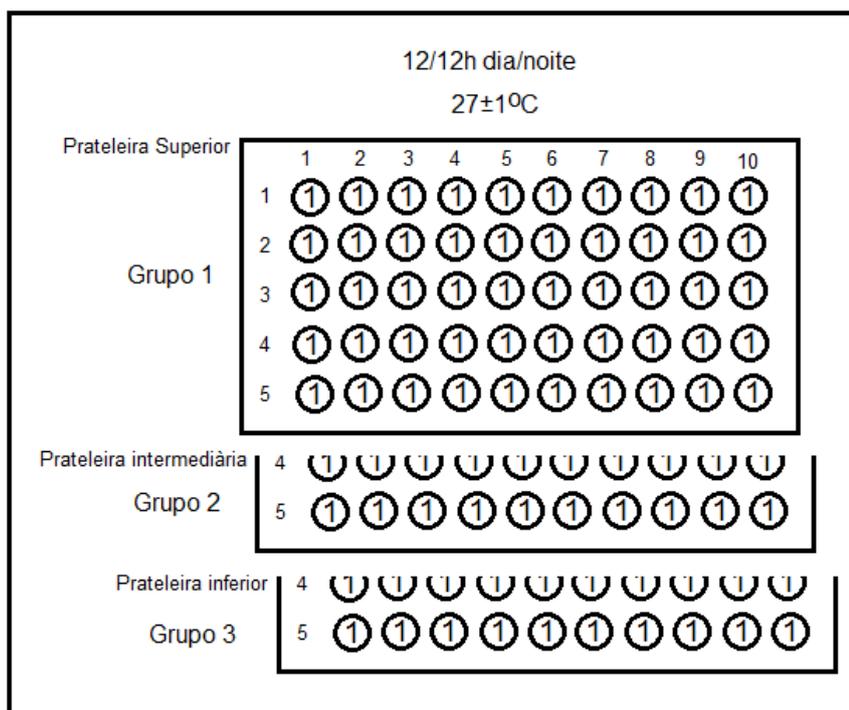


Figura 17. Desenho experimental do bioensaio 1 referentes à otimização da manutenção em laboratório dos anfípodas *A. brasiliensis*.

3.3.1.2 Bioensaio 2

Neste bioensaio, os anfípodas foram coletados no mesmo local com a mesma metodologia do anterior. Estes porém foram divididos em 5 grupos de 5 indivíduos, em recipientes plásticos de 11 x 16 cm x 8,5 cm de altura (Figura 18). Cada recipiente continha no fundo aproximadamente 1 cm de areia umedecido com 5 mL de água do mar diluída (1 ml de água do mar para 1 mL de água destilada, 1:1). A cada 4h os recipientes eram borrifados com aproximadamente 1mL de água. Todos foram submetidos a fotoperíodo igual de 12h/12h dia/noite e temperatura ambiente (24°C). Ao final do experimento os anfípodas dos grupos 1 a 4 foram fixados em paraformaldeído 4% (Pf 4%) e o 5º grupo foi fixado em álcool 92,8 (Al 92,8). A otimização das condições de manutenção foi avaliada através dos valores de sobrevivência dos mesmos em 48h.

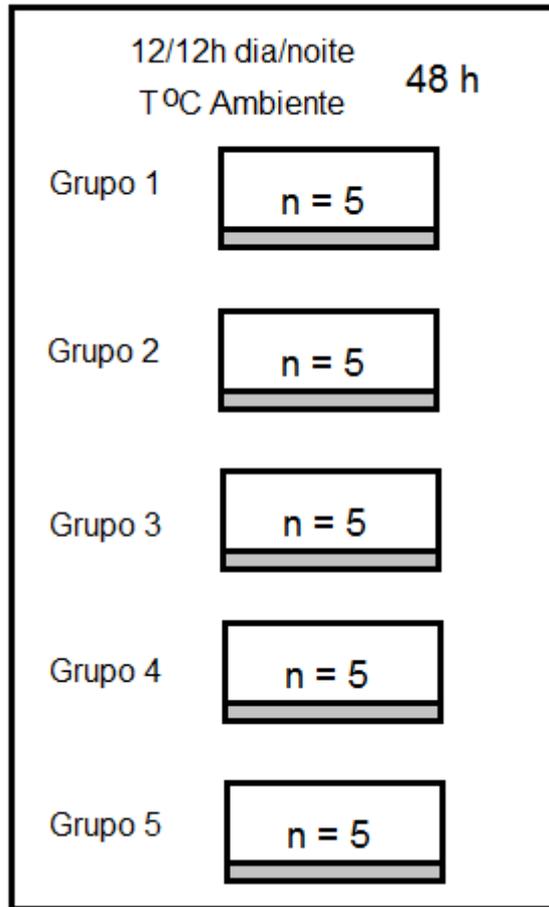


Figura 18. Desenho experimental do bioensaio 2 referentes à otimização da manutenção em laboratório dos anfípodes *A. brasiliensis*

3.3.1.3 Bioensaio 3

Neste bioensaio foram utilizados anfípodes coletados na praia do Barreto (ver Tabela 1). Dez juvenis foram selecionados, determinados seus padrões de pigmentação e em seguida individualizados em pequenos recipientes transparente contendo areia úmida com a diluição de água do mar e água destilada (1:1), e ração comercial composta de krill (FD krill, Sera). Os recipientes foram cobertos com filme plástico transparente, com pequenos furos para a troca de ar; e a seguir foram colocados sobre uma bandeja branca. Uma lâmpada foi posicionada 35cm acima da bandeja de forma a iluminar todos os recipientes, sendo os anfípodes expostos a fotoperíodos de 12h de luminosidade (Irradiância; Luz visível = 1,169 mW/cm²) e 12 horas em escuridão constantes por 10 dias consecutivos.

Neste bioensaio foi utilizada a lâmpada de irradiância luminosa a utilizar nos biosensaios seguintes, para já avaliar a sobrevivência dos indivíduos com essa iluminação. A ocorrência de animais mortos foi conferida a cada quatro horas. Ao final do bioensaio todos os anfípodes foram fixados em álcool 92,8.

3.3.2 Efeito do grau de luminosidade no padrão de pigmentação de *A. brasiliensis*

3.3.2.1 Bioensaio 4

Foi estabelecida a hipótese nula H_0 : a variação de luminosidade não altera o padrão individual de pigmentação. Para a realização deste bioensaio os anfípodes foram coletados na praia do Barreto no dia 18 de julho de 2015. A amostragem seguiu a mesma metodologia do primeiro bioensaio. Os anfípodes foram divididos em 3 grupos, cada um contendo 10 indivíduos (Figura 19). Os anfípodes foram colocados em um recipiente contendo areia úmida e uma unidade de ração de krill, sendo mantidos a temperatura ambiente de aproximadamente 24°C, por 96h.

Para a determinação do padrão de pigmentação dos olhos, os anfípodes foram posicionados individualmente em placas de petri sob gelo para que houvesse diminuição da sua atividade motora e seus padrões pudessem ser determinados sob lupa. O grupo 1, teve seus padrões registrados e em seguida foram fixados em Pf 4%. O grupo 2 foi submetido a fotoperíodo de 12h de iluminação constante (Irradiância; Luz visível = 1,169 mW/cm²) e 12h de escuridão completa, após o registro dos padrões de pigmentação iniciais. No grupo 3 se seguiu o mesmo protocolo do grupo 2, porém os indivíduos foram submetidos à 24h de escuridão, a qual foi obtida acondicionando os anfípodes em caixas plásticas pretas com tampa com pequenos furos para que houvesse a troca de ar e cobertas por um tecido preto. Após as 96h de exposição às diferentes condições de luz os anfípodes novamente tiveram seus padrões de pigmentação registrados antes e após serem fixados em Pf 4%.

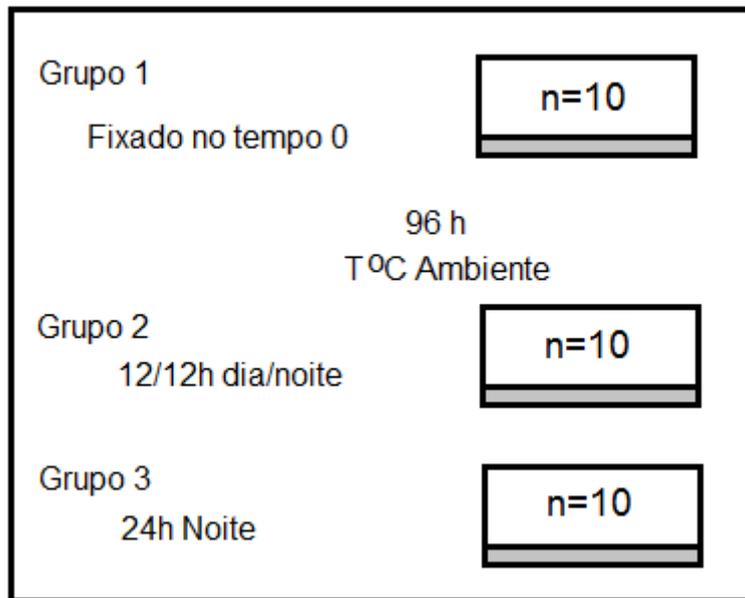


Figura 19. Desenho experimental do bioensaio 4 de avaliação do efeito da incidência luminosa no padrão de pigmentação do olho do anfípode *A. brasiliensis*

3.3.2.2 Bioensaio 5

Este bioensaio foi realizado, no setor de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) do Campus Carreiros da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, FURG, na cidade de Rio Grande, RS. As coletas dos anfípodas foram realizadas em duas praias: praia Campista localizada no município de Macaé, e na praia de Mar do Norte localizada no município de Rio das Ostras, RJ, em julho de 2015 (ver coordenadas em Tabela 1).

Estas praias foram escolhidas por terem apresentado anfípodas com maior porcentagem de fenótipos extremos de acordo com coletas anteriores. De acordo com dados de coletas anteriores para a praia Campista, os anfípodas apresentaram em maior proporção os padrões 3 e 4 (com ausência de pigmento em mais de 50% dos omatídeos) e na praia de Mar do Norte 100% dos indivíduos coletados apresentavam fenótipo 0 (com os olhos totalmente pigmentados). Foram coletados aproximadamente 700 anfípodas na praia de Mar do Norte e 700 na praia Campista. Os indivíduos coletados nas praias foram armazenados em caixas térmicas e transportados até a Fundação Universidade do Rio Grande, RS. Cada caixa térmica continha areia da praia, alimento e para manter o ambiente úmido utilizou-se a diluição 1:1 de água do mar/água destilada. A água foi esterilizada por 30 min em capela de fluxo laminar (~254 nm UV).

No biotério aquático do ICB da FURG, os anfípodas em boas condições após a viagem foram individualizados e tiveram seus padrões de pigmentação determinados sobre o gelo, como descrito no bioensaio anterior. Com a finalidade de testar H_0 decidiu-se com este bioensaio, avaliar se os anfípodas apresentaram mudanças no padrão de pigmentação em três situações distintas: iluminação constante com a lâmpada posicionada a 35cm acima dos anfípodas (Irradiância = 2,58mW/cm², Dose = 55,728 J/cm², Grupo 2), escuridão constante (assim como descrito no bioensaio anterior, Grupo 3), e outro sob iluminação do ambiente durante um período de 12 h.(Grupo 1) Ao total 10 indivíduos de padrão 3 foram alocados em cada unidade experimental, somando trinta animais por praia (Figura 20). Os padrões foram determinados três vezes durante o bioensaio; no tempo 0 h (início), às 6 h e 12 h. Ao final do bioensaio, os anfípodas foram fixados em álcool 92,8.

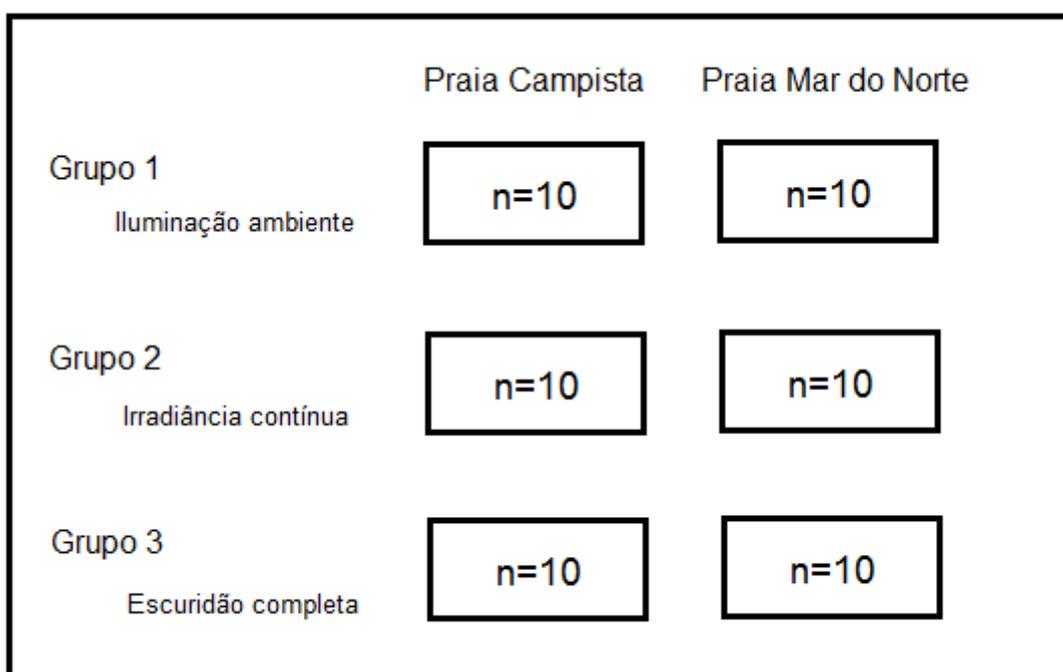


Figura 20. Desenho experimental do bioensaio 5 de avaliação do efeito da incidência luminosa no padrão de pigmentação do olho do anfípode *A. brasiliensis*.

3.3.2.3 Bioensaio 6

A seguir o bioensaio 6, foi realizado em condições diferentes com o objetivo de detectar mudanças em intervalos curtos de tempo durante o dia (com iluminação) e

durante a noite (sem iluminação) Para este bioensaio, 10 anfípodas de cada praia provenientes da mesma coleta do bioensaio 5 foram selecionados. Os anfípodas foram acondicionados em recipientes distintos contendo areia úmida e ração a base de krill e expostos a fotoperíodos de 12h sob luz direta (Irradiância = 2,58mW/cm², Dose = 55,728 J/cm²) e 12h no escuro completo (Figura 21). Os padrões de pigmentação foram observados no início do bioensaio e a cada três horas no intervalo de 51h. Durante o período da noite, os anfípodas foram observados na lupa usando uma lâmpada vermelha.

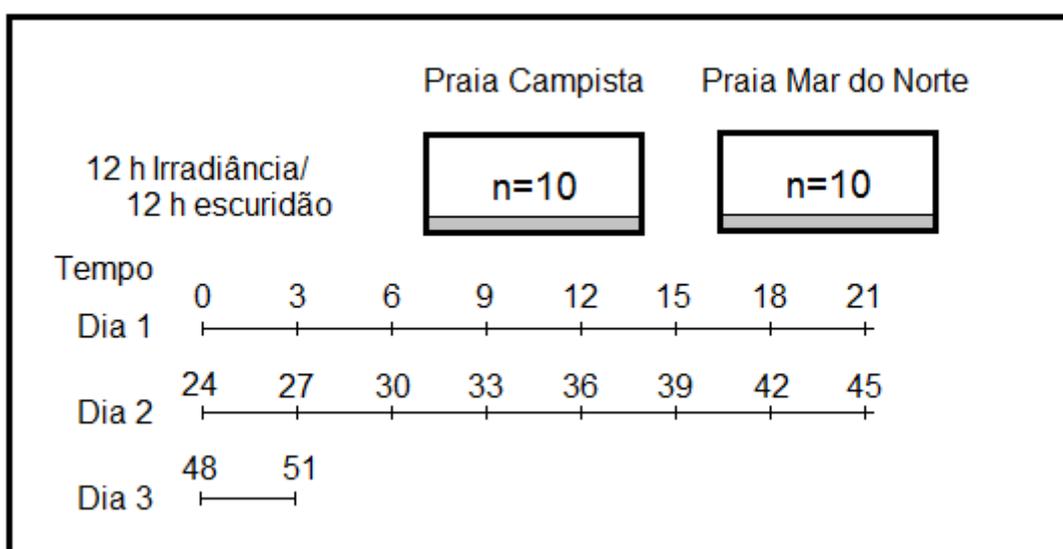


Figura 21. Desenho experimental do bioensaio 6 de avaliação do efeito da incidência luminosa e da escuridão completa, no padrão de pigmentação do olho do anfípode *A. brasiliensis* em intervalos de tempo curtos.

3.3.3 Avaliação da influência da radiação Ultravioleta no padrão de pigmentação de *A. brasiliensis*

3.3.3.1 Bioensaio 7

Este bioensaio também foi realizado na FURG, a partir das mesmas coletas descritas no ponto 3.3.2.2. A hipótese nula de trabalho Ho₂ foi que a radiação ultravioleta não afeta o padrão de pigmentação individual dos olhos de *A. brasiliensis*. Para testar esta hipótese, três tratamentos distintos foram utilizados, são eles: exposição à radiação UV-A, UV-B e o controle. Para cada tratamento 20 anfípodas de padrão 3

foram separados (Figura 22) e colocados em recipientes contendo areia úmida e ração de krill. O grupo 1, controle não foi exposto a radiação, apenas foi mantido na iluminação do ambiente. Todos os anfípodas tiveram seus padrões determinados no final do experimento.

A radiação UV-A e UV-B foi medida utilizando o radiômetro fotômetro (modelo IL 1400A, *International Light*, New-buryport, MA, USA). A lâmpada UV-A registrou irradiância de 0,219 mW/cm², sendo assim, a dose calculada foi de 1,8144 J/cm². A lâmpada UV-B registrou irradiância de 0,070 mW/cm², e a dose calculada foi de 1,8144 J/cm². O cálculo da dose seguiu a fórmula: Dose (J/cm²) = [60 x IRRAD (mW/cm²) x T (min)]/1000. Para que os valores das doses emitidas pelas lâmpadas UV-A e UV-B fossem semelhantes as doses registradas ao meio dia do verão, foi feito o cálculo do tempo de exposição necessário. Assim, o tempo de exposição calculado para as duas foi de 240 min.

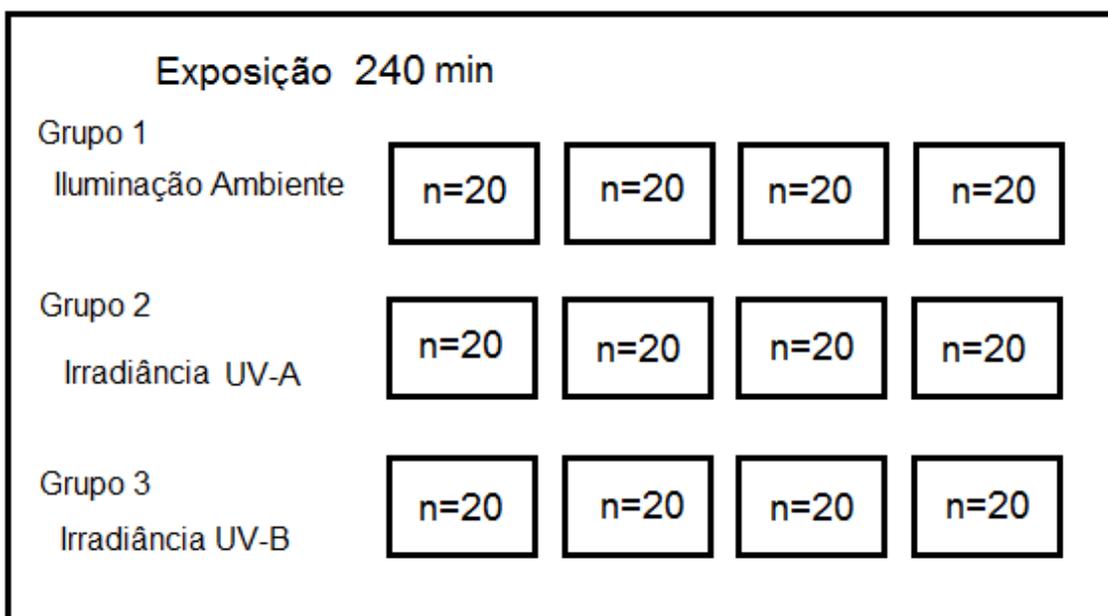


Figura 22. Desenho experimental do bioensaio 7 da avaliação do efeito da radiação ultravioleta no padrão de pigmentação dos olhos do anfípode *A. brasiliensis*.

3.3.3.2 Bioensaio 8 – Avaliação do efeito da incidência da radiação UVB ao longo do tempo.

Com o mesmo objetivo do bioensaio 7, os anfípodas foram coletados na praia do Barreto, seguindo a mesma metodologia de coleta do bioensaio anterior. Foram utilizados 6 grupos, cada um contendo 5 indivíduos, que foram alocados em recipiente de vidro (18,5 cm de comprimento e 9,5 cm de diâmetro) O primeiro grupo de anfípodas teve seus padrões imediatamente identificados e sem serem expostos ao UV-B, foram fixados em Pf 4% (tempo 0 de exposição). Os demais grupos tiveram seu padrão determinado após a exposição ao UV-B na sequência de diferentes tempos de exposição, como mostra a Figura 23. A radiação UV-B foi emitida por uma lâmpada de banda curta de UV-B (Phillips, 305 nm – 315 nm). No término de cada exposição os anfípodas tiveram seu padrão de pigmentação determinado e foram fixados em Pf 4%, para futuras análises histológica dos olhos.

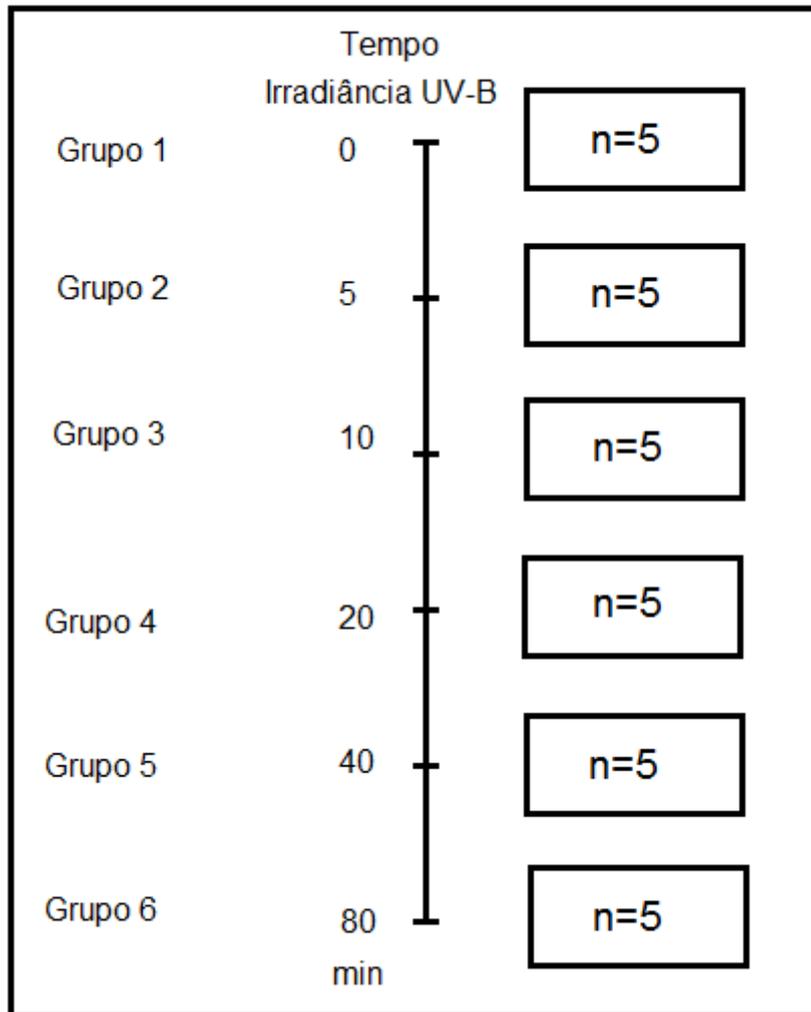


Figura 23. Desenho experimental do bioensaio 8 da avaliação do efeito da incidência da radiação UV-B ao longo do tempo nos padrões de pigmentação do anfípode *A. brasiliensis*.

3.3.4 Avaliação do efeito da cor do substrato no padrão de pigmentação dos olhos de *A. brasiliensis* (efeito de camuflagem)

3.3.4.1 Bioensaio 9

Os anfípodas utilizados neste bioensaio foram coletados na praia do Barreto, município de Macaé (ver coordenadas em Tabela 1). A hipótese nula (H_0) levantada foi que a cor do substrato não altera o padrão individual de pigmentação dos olhos de *A. brasiliensis*. Para testar esta hipótese, os anfípodas (com padrão 3 ou 4) foram separados em 2 grupos de 10 indivíduos cada um. O grupo 1 teve os animais alocados em recipientes totalmente pretos, contendo apenas água (água do mar/água destilada, 1:4). O grupo 2 foi alocado em recipientes transparentes com fundo branco contendo apenas

um pouco de areia e água (água do mar/água destilada, 1:4) (Figura 24). Os anfípodas foram posicionados sob a luz direta a uma distância de 48 cm (Irradiância; Luz visível = 1,169 mW/cm²), e foram registrados seus padrões em 3 horários por dia (8h, 14h e 20h), durante 9 dias.

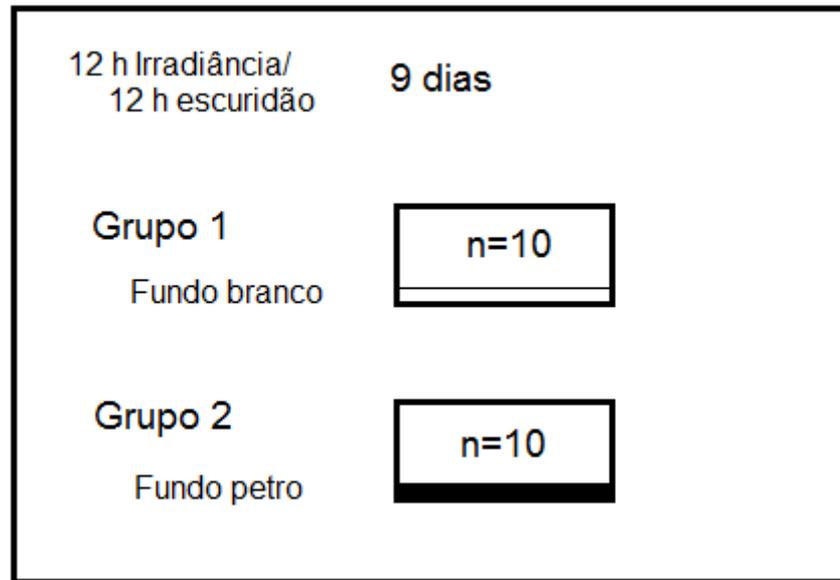


Figura 24. Desenho experimental do bioensaio 9 da avaliação do efeito da cor do substrato no padrão de pigmentação dos olhos do anfípode *A.brasiliensis* (efeito de camuflagem)

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Padronização das condições ideais de manutenção dos anfípodes *A. brasiliensis* em laboratório

3.4.1.1 Bioensaio 1

Neste bioensaio todos os anfípodes morreram dentro das primeiras 20h do início do bioensaio, devido ao ressecamento, pela perda de umidade no ambiente dentro da incubadora.

3.4.1.2 Bioensaio 2

A solução diluída de água do mar preparada com água destilada (1:1) para umidificar a areia e ao mesmo tempo evitar a salinização do microambiente, melhorou a sobrevivência dos anfípodes. Assim, a sobrevivência foi de 100% nas 24 h em todas as unidades. Observou-se mortalidade no grupo 2 (40%) nas 44h, finalizando as 48 h com mortalidade acumulada média por unidade de $76 \pm 43,3\%$ (Figura 25).

A redução da salinidade da água utilizada para manter as unidades experimentais úmidas determinou um ambiente menos hostil (“salgado”) e mais “confortável” para os crustáceos, auxiliando de certa forma a aumentar o tempo de vida e permanência dos mesmos em laboratório.

O tipo de fixador (Pf 4% e Al 92,8) não determinou mudanças nos padrões individuais de pigmentação dos olhos. No entanto, observou-se que aqueles anfípodes que morreram antes de serem fixados, seus olhos se tornam padrão 0 após a morte, e este padrão se manteve após a fixação, seja com Pf 4% ou com Al 92,8.

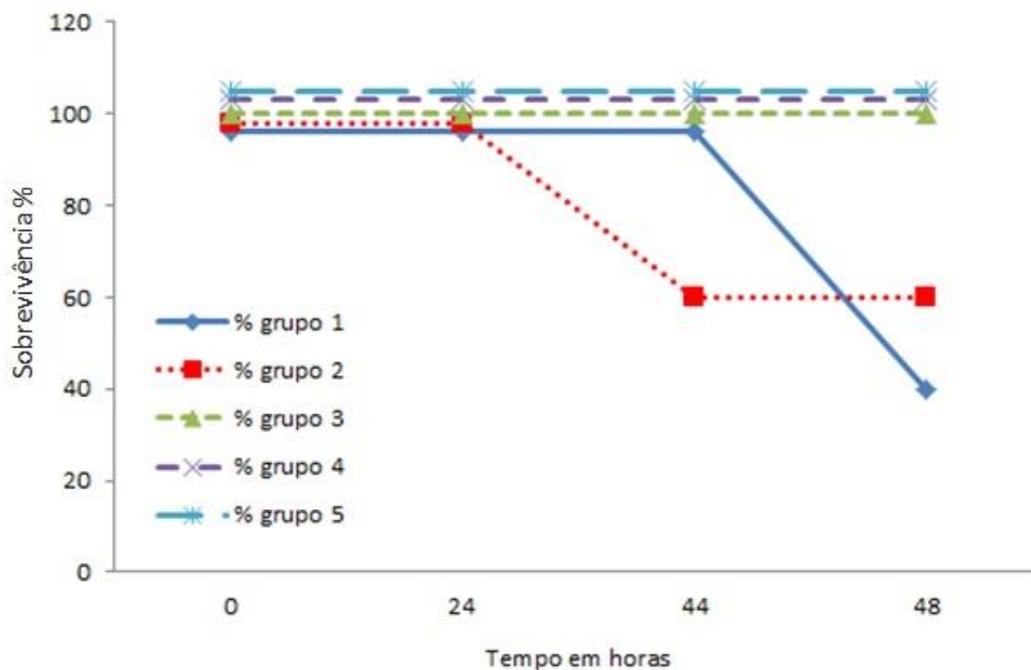


Figura 25. Resultados do bioensaio 2 na avaliação da sobrevivência dos indivíduos nas novas condições de manutenção a temperatura ambiente e manutenção da umidade adicionando água do mar diluída durante todo o bioensaio.

3.4.1.3 Bioensaio 3

Neste bioensaio, onde foi avaliado a sobrevivência de juvenis individualizados e cobertos com insulfilm com furos muito pequenos e uma unidade de Krill como alimento e em condições de temperatura ambiente, a mortalidade foi muito menor comparada com os bioensaios anteriores. A sobrevivência baixou no segundo dia para 90% e somente no oitavo e nono dia, esta abaixou para 70%, indicando condições de manutenção bastante favoráveis em relação aos bioensaios anteriores.

Em resumo, através destes bioensaios (Bioensaios 1 a 3), constatou-se que para a realização dos bioensaios com *A. brasiliensis* a umidade deve ser priorizada para o manutenção dos mesmos, levando-a mais em consideração do que outros fatores como a temperatura; e que a individualização, a alimentação com uma unidade de alimento comercial de krill e a constante adição de água de mar diluída permitem a sobrevivência destes indivíduos por períodos superiores a uma semana

3.4.2 Efeito da incidência luminosa no padrão de pigmentação do olho.

3.4.2.1 Bioensaio 4

Os anfípodes do grupo 1, que representaram o controle, organismos fixados imediatamente, antes de serem submetidos às condições de laboratório, apresentaram mudanças do padrão de pigmentação após serem fixados em Pf 4%, tornando-se padrão 0 (100% pigmentados), independente do qual foi o padrão inicial. Os anfípodes do grupo 2, submetidos a 12h/12h dia/noite não apresentaram nenhuma variação de seu padrão de pigmentação durante o bioensaio de 96 h, mantendo o padrão 2, inclusive após a fixação.

Cinquenta por cento dos anfípodes do grupo 3, aqueles mantidos na escuridão completa, tiveram seu padrão de pigmentação alterado para um grau a mais de pigmentação (de 4 para 3 e de 3 para 2) (Anexo 6). Os padrões finais foram mantidos após a fixação. Portanto, houve efeito do fixador somente nos indivíduos fixados imediatamente após a coleta.

3.4.2.2 Bioensaio 5

Os anfípodes coletados para os bioensaios no ICB da FURG de Rio Grande, nas praias Campista e Mar do Norte, mostraram a predominância do padrão 3 (>95%) (Tabela 11).

Tabela 11. Frequência dos padrões de pigmentação do anfípode proveniente das praias Campista e Mar do Norte, em junho de 2015.

Fenótipo	Praia de Mar do Norte		Praia Campista	
	Quantidade		Quantidade	
	N	%	N	%
2	4	1,90	1	0,75
3	204	96,68	131	99,25
4	3	1,42	-	-

Foi constatado que o padrão de pigmentação não variou em nenhum anfípode deste bioensio, mantendo-se o padrão 3 inalterado do início ao fim do bioensaio (Tabela 12).

Tabela 12. Padrões de pigmentação observados no bioensaio 5 de 12 h para os grupos de indivíduos da praia Campista e da praia de Mar do Norte.

Tratamento	Campista				Mar do Norte			
	N	0h	6h	12h	N	0h	6h	12h
Iluminação ambiente	10	3	3	3	10	3	3	3
Irradiância	10	3	3	3	10	3	3	3
Escuridão	10	3	3	3	10	3	3	3

3.4.2.3 Bioensaio 6

Neste bioensaio de 51 h de duração em fotoperíodo de 12/12, com registro dos padrões a cada 3 h, observou-se uma mortalidade acumulada de 30% para os anfípodes provenientes da praia Campista e de 40% para os provenientes de Mar do Norte. Não foram observadas alterações dos padrões em nenhum momento deste bioensaio, em nenhum dos grupos de indivíduos (Tabela 13).

Tabela 13. Mortalidade acumulada observada durante o bioensaio 6.

Campista			Mar do Norte		
Mortalidade acumulada			Mortalidade acumulada		
Hora	N	%	Hora	N	%
24	1	10	24	1	10
27	2	20	27	2	20
48	3	30	30	4	40

Em resumo, através destes bioensaios (Bioensaios 4 a 6) podemos comprovar que não há uma indução por efeito da incidência luminosa na migração dos pigmentos dos olhos, que possa ser detectado externamente, dentro de um período de 51 h (com avaliação a cada 3 h) ou dentro de 96 h (avaliação 4 vezes por dia) num regime de fotoperíodo de 12/12 h; nem para irradiação constante durante um período de 96 h. No

entanto, após 96 h de escuridão completa foi possível observar um leve aumento da pigmentação dos olhos em 50% dos indivíduos.

3.4.3 Avaliação da influência da radiação Ultravioleta sobre o padrão de pigmentação de *A. brasiliensis*

3.4.3.1 Bioensaio 7

Neste bioensaio, realizado no ICB da FURG, todos os anfípodas morreram após 15 min de incidência da radiação ultravioleta (UV-A e UV-B). Devido a que os animais controle também morreram aos 15 minutos, podemos concluir que as causas da morte destes anfípodas não esteve relacionada à incidência da luz ultravioleta.

3.4.3.2 Bioensaio 8

No bioensaio 8, já realizado no NUPEM, onde os indivíduos foram submetidos por períodos diferentes a radiação UV-B, não houve nenhuma alteração dos padrões de pigmentação para nenhum dos tempos de exposição a radiação UV-B, em relação aos padrões inicialmente observados, mantendo (Tabela 14).

Tabela 14. Padrões de pigmentação iniciais e finais observados nos anfípodas do bioensaio 8, no início e ao final da exposição a radiação UV-B.

Grupo	Tempo de exposição ao UV-B (min)	Indivíduo	Padrão de pigmentação	
			Inicial	Final
1	0	1	3	3
		2	3	3
		3	3	3
		4	3	3
		5	3	3
2	5	1	3	3
		2	3	3
		3	3	3
		4	3	3
		5	3	3

3	10	1	2	2
		2	3	3
		3	3	3
		4	3	3
		5	3	3
4	20	1	3	3
		2	3	3
		3	3	3
		4	3	3
		5	3	3
5	40	1	3	3
		2	3	3
		3	3	3
		4	3	3
		5	3	3
6	80	1	3	3
		2	3	3
		3	3	3
		4	3	3
		5	3	3

Em resumo, os resultados do bioensaio 8, já que o 7 teve que ser descartado, mostraram que a radiação ultravioleta não teve efeito sobre os padrões de pigmentação dos olhos do anfípode *A. brasiliensis* dentro de um período de 80 min, utilizando comprimentos de onda de 305 a 315 nm. Por tanto, não podemos descartar a hipótese nula da ausência de efeito da radiação UV sobre os padrões de pigmentação.

3.4.4 Avaliação do efeito da cor do substrato no padrão de pigmentação do olho de *A. brasiliensis* (efeito de camuflagem)

3.4.4.1 Bioensaio 9

Neste bioensaio, os anfípodas submetidos ao tratamento com fundo preto começaram a morrer a partir do sexto dia, com 60% dos anfípodas mortos ao final do experimento no nono dia. (Anexo 6). Nas unidades com fundo branco, a mortalidade dos anfípodas iniciou a partir do terceiro dia, com 60% dos anfípodas mortos ao final do experimento (Anexo 7).

Nas unidades de fundo preto não houve variação do padrão de pigmentação, mas nas unidades de fundo branco 30% apresentaram alteração do padrão, indo do 3 (inicialmente observado) para o padrão 4 (Anexos 6 e 7).

Em resumo, podemos afirmar que houve mudanças leves no padrão de pigmentação dos olhos em 50% dos anfípodes sobre fundo branco e que as mortalidades observadas foram de 60 % no final do experimento.

4. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO OLHO COMPOSTO DE *A. BRASILIENSIS*

4.1 INTRODUÇÃO

Os olhos dos animais e sua evolução compõem uma das questões mais intrigantes e fascinantes da ciência, e vem sendo estudada por muitos autores que debruçam-se até os dias atuais para decifrar as mais capciosas questões a respeito de sua formação, morfologia, fisiologia, captação de fótons e formação de imagens, buscando entender como todas estas questões podem influenciar nos mais diversos comportamentos entre os diferentes táxons do reino animal. Imagina-se que os animais convergiram para oito tipos de soluções ópticas para coletar e focalizar a luz, e compartilham a mesma estratégia molecular para absorver fótons (Fernald, 2000). A chave para a evolução dos primeiros olhos está relacionada ao número de receptores, à presença de pigmentos refletores, à membrana e o foco óptico. Tais adaptações funcionais dos olhos estão diretamente relacionadas aos mais diversos tipos de comportamento observado no reino animal (Land e Nilson, 2012).

4.1.1. O olho composto em crustáceos

Os crustáceos podem apresentar diferentes tipos de olhos. Entre eles estão; o olho pigmentado em forma de concha, olho do tipo câmara aquática, olho côncavo refletor, olho composto aposicional, olho composto refratário superposicional, e o olho composto refletor superposicional (Land e Nilson, 2012).

Os órgãos mais visíveis e mais bem estudados em crustáceos são os olhos compostos (Meyer-Rochow, 2001). Os olhos alcançam seu maior grau de sofisticação em estomatópodes (Cronin et al., 1994), euphasídeos (Land, 1981), e decápodes (Herring e Roe, 1988), mas estão ausentes em copépodes, mistacocarida, cefalocárida e alguns grupos menores com poucas espécies (Meyer-Rochow, 2001). Assim os crustáceos apresentam olhos com foco óptico e alta resolução espacial. Por serem mais evoluídos que os de outros grupos, requerem receptores rápidos com sensibilidade angular mais restrita e alta sensibilidade ao contraste, necessitando capturar mais fótons por unidade de tempo (Land e Nilson, 2012). Outras questões que tem recebido uma grande atenção nos últimos anos estão relacionadas com a fototransdução, o

processamento visual, o desenvolvimento embriológico, e a ontogenia dos olhos compostos aposicionais, especificamente em *Drosophila* (Meyer-Rochow, 2014).

Com base em análises oriundas de comparações das estruturas gerais dos olhos de diferentes táxons (tipos de fotorreceptores, o desenvolvimento do olho, as origens do tecido ocular, a posição dos axônios entre outros marcadores anatômicos), sabemos hoje que os olhos não evoluíram apenas uma vez, mas ao menos quarenta vezes diferentes, ou possivelmente muito mais. A distribuição filogenética dos olhos compostos em artrópodes é considerada extremamente complexa, onde por um lado a semelhança entre olhos compostos sugere que eles possam ter evoluído apenas uma vez, mas por outro lado em muitos artrópodes faltam olhos por nenhuma razão aparente. Embora alguns autores sugiram à homologia, as evidências recentes sugerem múltiplas origens (Oakley, 2003; Salvini-Plawen e Mayr, 1977)

4.1.2. Estrutura e pigmentação ocular em Amphipoda

Os anfípodes apresentam olhos compostos, extremamente adaptados para funções e ambientes específicos. Sabe-se que uma enorme quantidade de espécies de anfípodes, alocadas em diferentes famílias, apresentam um padrão comum no design dos olhos compostos (Hallberg et. al., 1980; Mezzetti et. al., 2010a). Segundo Hallberg et.al. (1980), ao estudar a estrutura ocular em treze espécies de anfípodes alocadas em três subordens (Gammaridea, Hyperiidia e Caprellidae), encontraram olhos compostos em todas, considerando suas estruturas complexas e sésseis. Uma característica única de anfípodes é a presença de uma hipoderme totalmente desenvolvida e uma lâmina basal entre a cutícula e o omatídeo; além de uma membrana fenestrada, formada pelas células glias, abaixo do rabdoma, dividindo o olho composto em duas metades, onde na proximal (interna) são encontrados apenas os núcleos das células retinulares e das células da glia e na região distal (mais externa) acima da membrana fenestrada, encontram-se a maior porção do citoplasma, as células retinulares com o rabdoma, o cone cristalino, e as células de pigmento acessório (Figura 26). Estruturalmente, podem ser classificados em 4 tipos de acordo com o grupo taxonômico. O tipo de olhos da subordem Gammaridea (caso do *A. brasiliensis*) é considerado por este autor como o padrão geral dos anfípodes. Dois tipos de pigmentos foram encontrados, baseados em estudos em *Gammarus pulex*, contidos em vesículas dentro das células retinulares: um

omocromo, pigmento escuro (ex. preto) e um carotenóide, pigmento claro (ex. amarelo ou vermelho) (Michel e Anders, 1954; Hallberg et. al., 1980).

Poucos estudos abordam a caracterização da pigmentação e sua distribuição nos olhos dos anfípodes; e até o momento não foi possível encontrar informação sobre o registro de variação em anfípodes.

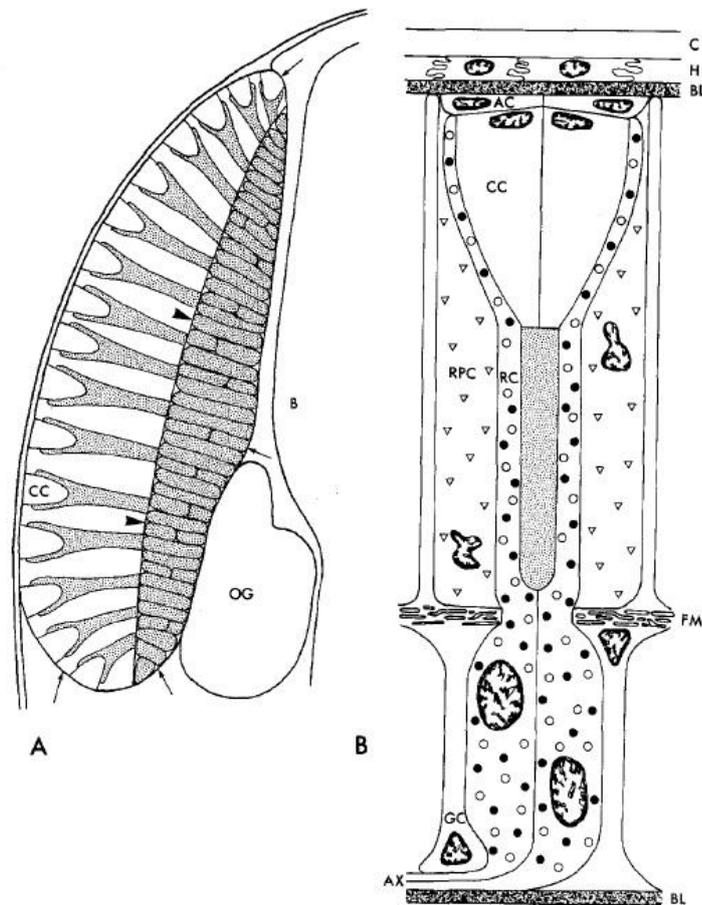


Figura 26. A. Representação esquemática de uma secção transversal da cabeça de *Gammarus pulex*. A célula retinular. A seta aponta para a lâmina basal que delimita o olho. As duas pontas de setas apontam a membrana fenestrada; (OG) gânglio ótico; (CC) cone cristalino; (B) “brain” indicando o cérebro. B. Esquema desenhado do omatídeo de *Gammarus pulex*. (AC) célula do cone acessório; (AX) axônio; (BL) lâmina basal; (C) cutícula; (CC) cone cristalino; (FM) membrana fenestrada; (GC) célula da glia; (H) camada da hipoderme; (RC) célula retinular; (RPC) célula de pigmento refletor. (Modificado de Hallberg et al., 1980).

4.2 OBJETIVOS

- Caracterizar a estrutura do olho composto de *A. brasiliensis* através de análise histológica.

- Avaliar descritivamente diferenças a nível histológico entre indivíduos classificados externamente com diferentes níveis de pigmentação no olho composto.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Microscopia óptica

4.3.1.1. Fixação dos anfípodes e contagem dos omatídeos

Os anfípodes utilizados para a realização dos cortes histológicos foram coletados em diferentes praias, entre elas Barreto, Campista, e Mar do Norte. Também foram utilizados anfípodes obtidos de bioensaios.

A contagem dos omatídeos foi realizada sob lupa, posicionando o olho do anfípode centralizado sobre a lente ocular milimetrada, dividindo-o em quatro quadrantes. A quantidade de omatídeos em cada quadrante foi contada e ao final obteve-se o total de omatídeos. Foram contabilizados os omatídeos de quatro anfípodes e destes foram obtidas a média, desvio padrão, e o valor mínimo e máximo.

Uma coleta piloto foi realizada na praia do Barreto, Macaé, RJ, e os anfípodes coletados foram fixados em paraformaldeído a 4% (Pf4%) preparado segundo o protocolo a seguir: 8g de paraformaldeído foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, em seguida foram adicionados 2 mL a 1 M de NaOH. A solução foi aquecida a aproximadamente 65°C até que o paraformaldeído fosse totalmente dissolvido, adicionando 1 ml de PBS 10 x e deixando a solução esfriar a temperatura ambiente. O pH foi ajustado a 7,4 utilizando 1M HCL (~1ml). O volume final foi então ajustado a 100 ml com água destilada. A solução final foi filtrada através de uma membrana filtradora (0,45 µm) para que fosse removida qualquer matéria particulada. A solução final foi então armazenada em freezer a temperatura -20°C). Os anfípodes foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 h a temperatura ambiente.

Foi realizada uma alteração na preparação de água do mar artificial (ASW) para a preparação de PBS (5x). Assim, para o preparo do paraformaldeído à 4%, houve a substituição do PBS anterior por um novo PBS (5x), que foi diluído para 2x.

O novo paraformaldeído a 4% foi preparado seguindo o seguinte protocolo: em uma placa de aquecimento com a temperatura de aproximadamente 60°C foram adicionados aproximadamente 45 ml de água destilada até que a mesma atingisse os 60°C esperados. Em seguida foram adicionados 4g de paraformaldeído até que o mesmo se encontrasse totalmente solubilizado e então foram adicionados aproximadamente 1 ml de NaOH a 1M. Após a solubilização do paraformol foram adicionados 50 ml de PBS (2x). A solução preparada foi avolumada para 1L, alíquotada e armazenada em freezer a temperaturas -20°C.

4.3.1.2. Emblocamento

Para o emblocamento, os anfípodes fixados com 24h de antecedência ao início do processamento dos cortes histológicos passaram por um processo de desidratação para que toda a água presente nos tecidos fosse removida, uma vez que as substâncias utilizadas para a inclusão em paraplast não se combinam homogeneamente com a água. Os anfípodes então foram posicionados em suportes plásticos (cassetes) e levados a bateria de desidratação. O protocolo de desidratação utilizado foi: 1) álcool 70% por 8 min; 2) álcool 80% por 8 min; 3) álcool 90% por 8 min; 4) álcool 100% I por 8 min; 5) álcool 100% II por 10 min; 6) álcool 100% III por 15 min; 7) álcool xilol por 15 min. Em seguida os anfípodes foram submersos em xilol para a clarificação do material; 8) xilol I por 10 min; 9) xilol II por 10 min; 10) xilol III por 10 min, finalizando, dois anfípodes foram posicionados em um molde com o auxílio de uma pinça, para que um ficasse posicionado lateralmente e outro dorso/ventral, sendo infiltrados em paraplast, (tomando cuidado para que bolhas não fossem formadas) seguindo a bateria: 11) paraplast I por 10 min; 12) paraplast II por 10 min, e 13) paraplast III por 15 min. Ao final do processo de inclusão, os anfípodes encontravam-se emblocados e corretamente posicionados no molde com paraplast.

4.3.1.3. Cortes histológicos e coloração

Os cortes histológicos seguiram protocolos pré-estabelecidos no Laboratório Integrado de Morfologia – NUPEM. Primeiramente os blocos foram posicionados em micrótomo rotativo (modelo RM 2245, LEICA), e cortes de 5 µm foram realizados. Cada corte realizado era levado ao banho maria e posicionados em lâminas de vidro.

Com os cortes devidamente posicionados, as lâminas eram levadas à estufa pré-aquecida a 60°C, por aproximadamente 30 minutos para que o excesso de paraplast fosse retirado. Após esse período foi dado início ao protocolo sequenciado de hidratação, coloração e desidratação do material da seguinte forma: 1) xilol I por 2 min; 2) xilol II por 2 min; 3) xilol III por 2 min; 4) álcool 100% por 2 min; 5) álcool 90% por 2 min, 6) álcool 80% por 2 min; 7) álcool 70% por 2 min; 8) água por 2 min; 9) hematoxilina de Harris por 8 min; 10) água destilada por 2 min; 11) eosina 0,25% por 6 min; 12) álcool 70% por 1 min; 13) álcool 80% por 1 min; 14) álcool 90% por 1 min; 15) xilol I por 1 min; 16) xilol II por 1 min; 17) xilol III por 1 min.

Alterações deste protocolo foram inseridas para que houvesse uma melhor coloração das estruturas oculares, sendo a principal delas o aumento no tempo de imersão com o corante hematoxilina de Harris que passou de 8 min para 13 min, e assim permaneceu nas posteriores baterias de coloração.

Uma vez prontas, as lâminas foram visualizadas em microscópio de luz (Olympus BX 51) com aumentos de (lentes objetivas nos seguintes aumentos: 4 x; 10 x; 20 x; 40 x; 100 x) e digitalizadas. As imagens foram analisadas posteriormente, baseando-se na caracterização e nomeação estabelecida por Hallberg (1980). As estruturas foram medidas com régua de 10 µm.

4.3.2. Microscopia eletrônica

Dois anfípodes foram selecionados para a realização da microscopia eletrônica, ambos com padrão de pigmentação 3. Para a realização da microscopia eletrônica de transmissão os anfípodes foram fixados em paraformaldeído a 4% com glutaraldeído, 2,5% por 24h.

Para o emblocamento, após serem fixados os anfípodes foram lavados 3 vezes seguidas de 10 min com o tampão PBS 1x, e depois fixados com tetróxido de ósmio 1% (OsO₂). Após a lavagem, foi dado início ao processo de desidratação com acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100% e novamente 100%) por 25 minutos cada. Ao final do processo de desidratação o processo de infiltração com acetona/epon dividido em quatro etapas, com duração de 24h cada uma. O material foi então submetido a infiltração em acetona (100%)/epon na proporção de 2/1; 1/1; 1/2; e ao final foram infiltrados apenas com epon puro, estando prontos para a realização dos cortes semi-finos e ultrafinos.

Os cortes semi-finos foram realizados no Ultramicrotomo (Leica EM UC7) nas espessuras de 500nm e 80nm (cortes ultrafinos), à velocidade de 0,6 mm/s. Primeiramente os cortes superfinos foram realizados até que de fato se alcançasse a estrutura ocular. Ao encontrar a estrutura ocular lâminas foram montadas com os cortes semi-finos e coradas com 1% azul de toluidina. Em seguida, os cortes ultrafinos foram realizados, posicionados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila por 20 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos, e levados para a visualização em microscópio eletrônico de transmissão.

4.3.3. Avaliação de diferenças a nível histológico entre indivíduos classificados externamente com diferentes níveis de pigmentação no olho composto

Foram comparados os cortes histológicos dos olhos de anfípodes com padrão de pigmentação 0 (que apresentaram mais de 50% dos omatídeos pigmentados), com anfípodes de padrão 3 e 4 (que apresentaram menos de 50% dos omatídeos pigmentados), tais observações foram realizadas comparando fotos de microscopia retiradas dos melhores cortes histológicos obtidos. Foram comparadas desde a espessura das células retinulares, dos rabdomas, cutícula, até mesmo a observação das estruturas de forma geral, procurando realizar uma análise minuciosa das possíveis similaridades e diferenças.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Caracterização histológica da estrutura do olho composto do anfípode *A. brasiliensis*

No olho composto de *A. brasiliensis* foram encontrados em média $358,2 \pm 63,8$ omatídeos sendo o número máximo contabilizado de 426, e o mínimo de 272. Analisando os cortes histológicos foi possível reconhecer algumas das estruturas caracterizadas por Hallberg et. al. (1980) para *Gammarus pulex* (Figura 26). Através do corte longitudinal da cabeça de *A. brasiliensis* conseguimos visualizar os dois olhos compostos, com o arranjo geral dos olhos individuais, os omatídeos (OM), formados pelo cone cristalino (CC), rabdoma (RB), e a base das células retinulares, onde se localizam seus núcleos. Também podemos observar o gânglio óptico (GO), e a camada

externa de cutícula (CT) (Figura 27 A, B) A disposição da base das células retinulares (BR), formam uma faixa densa escura por conta dos pigmentos retinulares. O comprimento do olho composto em corte transversal é de aproximadamente 514 μm e sua profundidade de 161,6 μm . No corte longitudinal da cabeça (Figura 27 b) pode-se observar a largura total do olho composto, indicado pela barra que a mede, sendo 33,6 μm . Se destaca o revestimento externo do olho protegido pela cutícula (CT). Nesta figura podemos também observar as células retinulares com seus pigmentos dispostos ao redor do rabdoma (RB). Distalmente o olho é revestido por uma camada de cutícula (CT), seguido de uma hipoderme (HP) e uma membrana basal (MB), conferindo uma proteção externa a estrutura ocular. A espessura da cutícula (CT) varia de 7,9 à 14,0 μm ; a hipoderme (HP) pode variar de 3,0 à 8,1 μm , e a lâmina basal (LB) apresentou 2,3 μm de espessura (Figura 28).

Os omatídeos (estrutura individual ocular) em *A. brasiliensis* são constituídos por diversas estruturas celulares que juntas proporcionam a este anfípode a capacidade de detecção da luz. Eles tem um comprimento aproximado de 112 μm , onde a região distal é formada pelo cone cristalino de 39,2 μm (Figura 29). Através de microscopia óptica foi possível detectar duas células do cone cristalino (CCC) (Figura 30), as células retinulares conhecidas como as células da visão e que estão posicionadas ao redor do rabdoma (RB) e as células acessórias de pigmento refletivo que se localizam entre os omatídeos (Figura 31). Dividindo a região distal da proximal encontra-se a membrana fenestrada (MF). Sobre esta membrana podem ser visualizados os núcleos das células acessórias (NA). Abaixo desta membrana estão localizados os núcleos das células retinulares (NR), e mais abaixo na região proximal, formando o gânglio óptico estão os axônios (AX) e as células da glia (CG) (Figuras 31). Esta espécie apresentou cinco células retinulares, sendo uma de menor tamanho (R5) em relação as demais (Figura 32). Podemos observar que as cinco células retinulares estão arranjadas de forma ligeiramente estrelada ao redor do rabdoma, contendo vesículas preenchidas com os grânulos de pigmentos (Figura 33).

4.4.2. Avaliação de diferenças a nível histológico entre indivíduos classificados externamente com diferentes níveis de pigmentação no olho composto

Cortes transversais nos mostraram a presença de pigmentos retinulares ao longo do rabdoma em diferentes níveis, podendo ser encontrados espalhados ou concentrados em regiões específicas, chegando até a região mais distal, envolvendo o cone cristalino (Figura 34 a, b). Os cortes transversais e longitudinais mostraram a dispersão dos pigmentos ao longo do rabdoma e do cone cristalino em diferentes níveis através da expansão ou concentração citoplasmática das células retinulares (Fig. 32); podendo ser encontrados distalmente ao redor das células do cone cristalino ou somente ao redor do rabdoma (Figura 35 A, B).

Em cortes longitudinais, pelas profundidades diferentes dos cortes não foi possível comparar entre padrão 0 e 4. No entanto nos cortes longitudinais obtidos se observam diferenças entre omatídeos com pigmentos estendidos ate o cone cristalino e outros até a base do rabdoma, mostrando incluso que omatídeos dos cantos do olho são mais curtos, exatamente nas regiões onde ainda é possível visualizar pigmentos externamente nos indivíduos de padrão 3 e 4. Dada a transparência do cone cristalino é de esperar que omatídeos com pigmentos ao redor do cone cristalino sejam visualizados externamente como omatídeos pigmentados (ver Figs. 34 e 35).

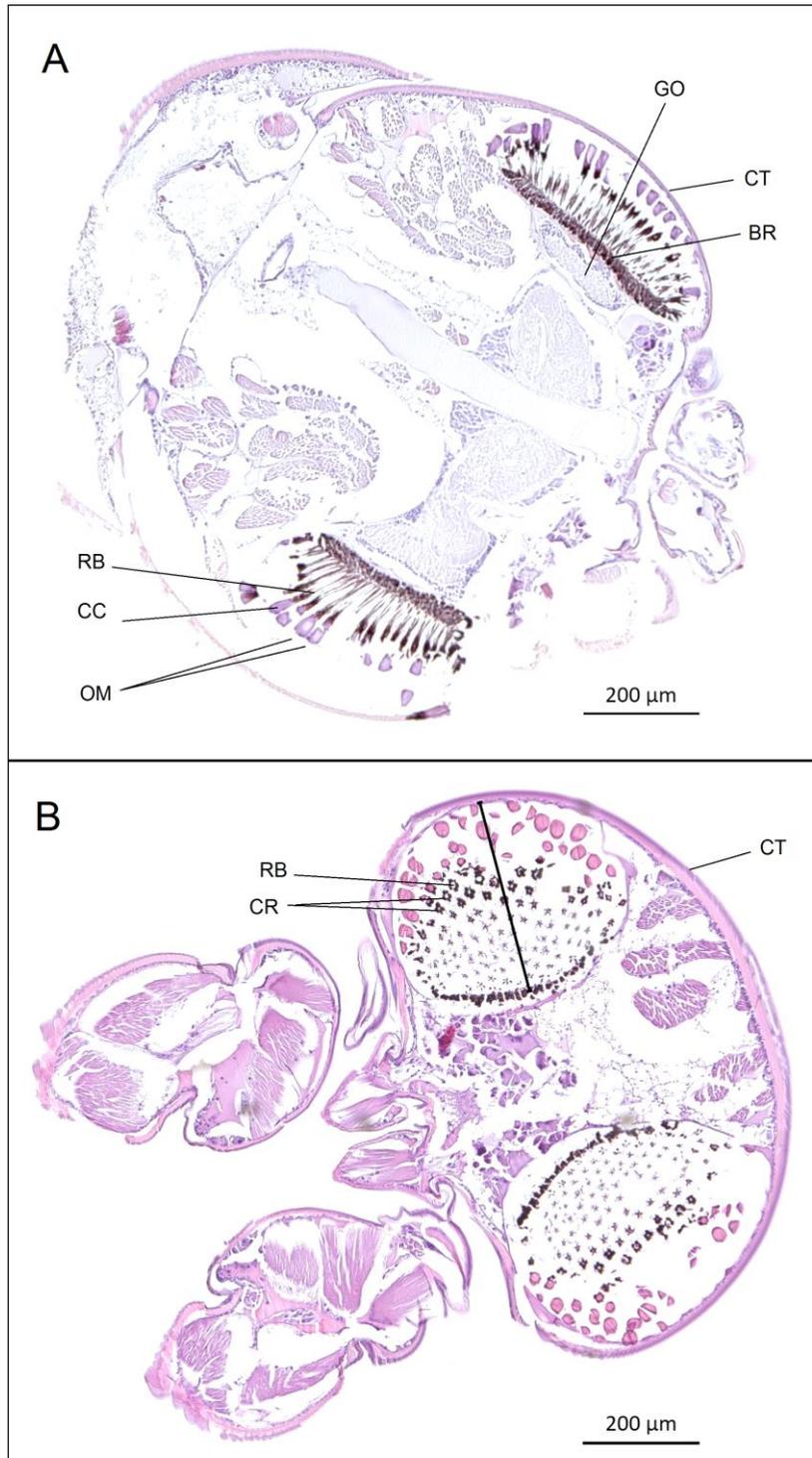


Figura 27. (A) Corte transversal da cabeça do anfípode *A. brasiliensis* com destaque para o par de olhos compostos. Se destaca o arranjo dos olhos individuais, os omatídeos (OM), firmados pelo cone cristalino (CC), o rabdoma (RB), e as células retinulares com suas bases (BR) onde encontram-se seus núcleos, formam uma faixa escura devido aos pigmentos retiniais. Também observamos a camada externa, a cutícula (CT) e o gânglio óptico (GO). (Aumento 10x).

(B) Corte longitudinal da cabeça do anfípode *A. brasiliensis*, em destaque as estruturas oculares protegidas distalmente pela cutícula (CT); e observa-se a largura do olho composto, indicado pela barra que mede 336 µm. Podemos observar as células retinulares (CR) com seus pigmentos ao redor do rabdoma (RB) (Aumento, 10x).

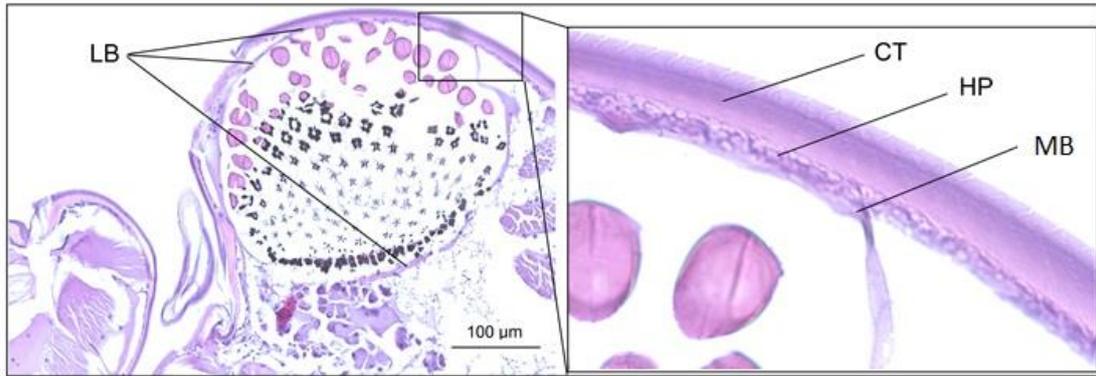


Figura 28. Corte longitudinal da cabeça do anfípode *A. brasiliensis*, em destaque as estruturas oculares protegidas distalmente pela cutícula (C), com a hipoderme (HP) e a membrana basal (MB) logo abaixo, formando a estrutura externa do olho (Aumento, 10x)

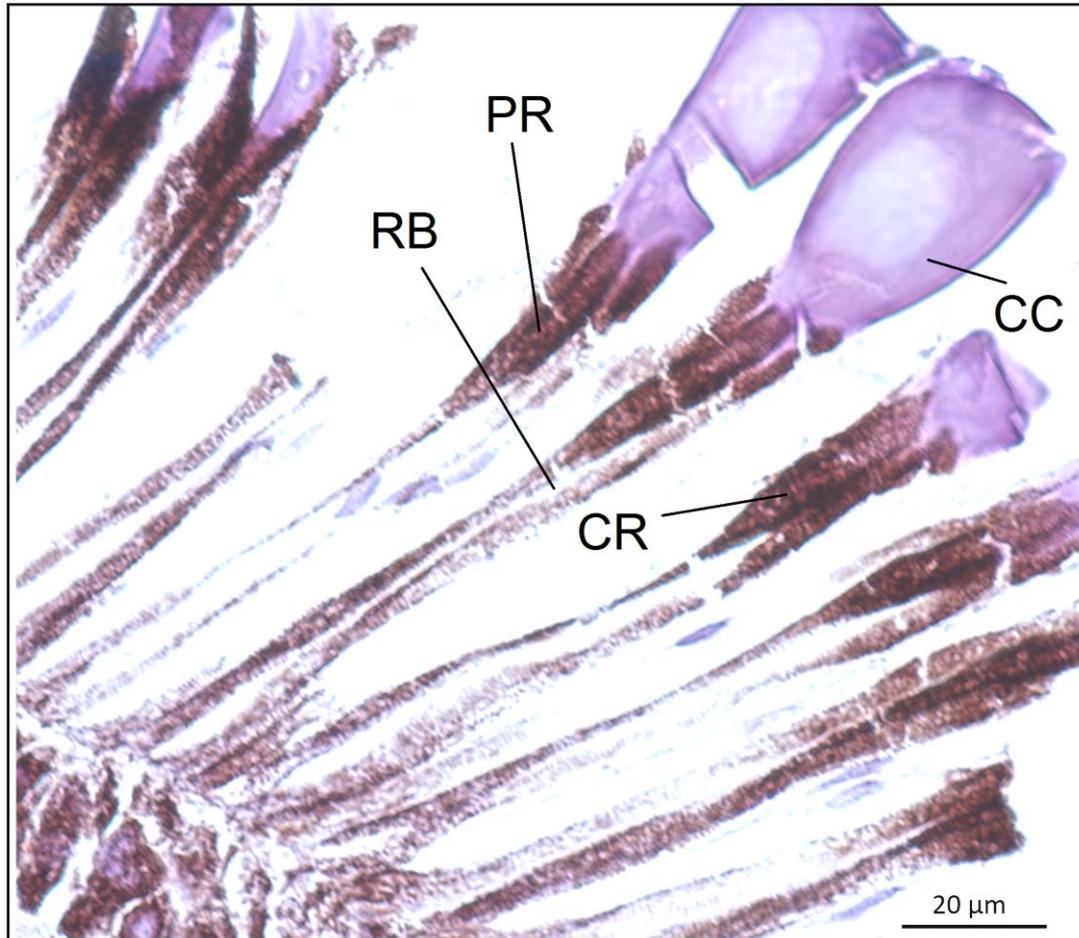


Figura 29. Corte transversal do olho do anfípode *A. brasiliensis*. Em destaque as células do cone cristalino (CC), os pigmentos retinulares (PR) dispersos no citoplasma das células retinulares (CR) posicionados distalmente ao redor do rabdoma (RB) (Aumento, 40x).

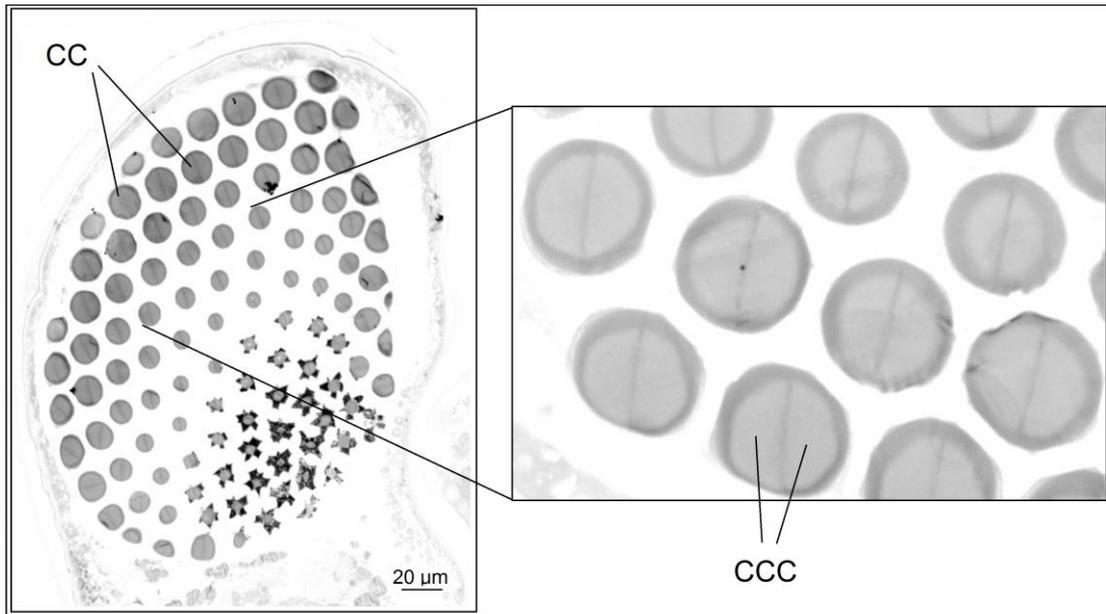


Figura 30. Corte longitudinal do olho de *A. brasiliensis*. Distalmente observam-se as células do cone cristalino (CC) (Aumento, 10x).

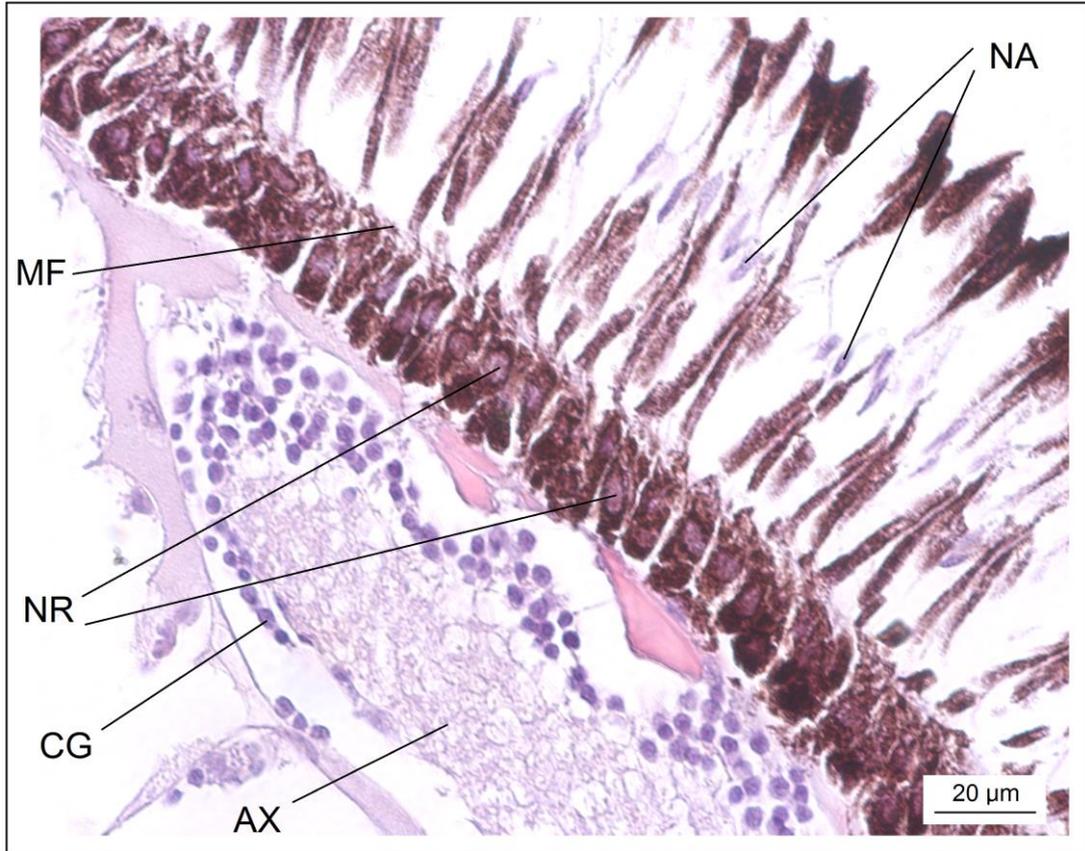


Figura 31. Corte transversal do olho de *A. brasiliensis*. Podemos observar na região distal os núcleos das células de pigmento refletivo (NA). Delimitando a região distal da proximal encontra-se a membrana fenestrada (MF), e logo abaixo os núcleos das células retinulares (NR) conectando-se com as células nervosas. O conjunto de células nervosas formado pelos axônios (AX) e as células da glia (CG) são chamados de gânglio óptico. (Aumento, 40x).

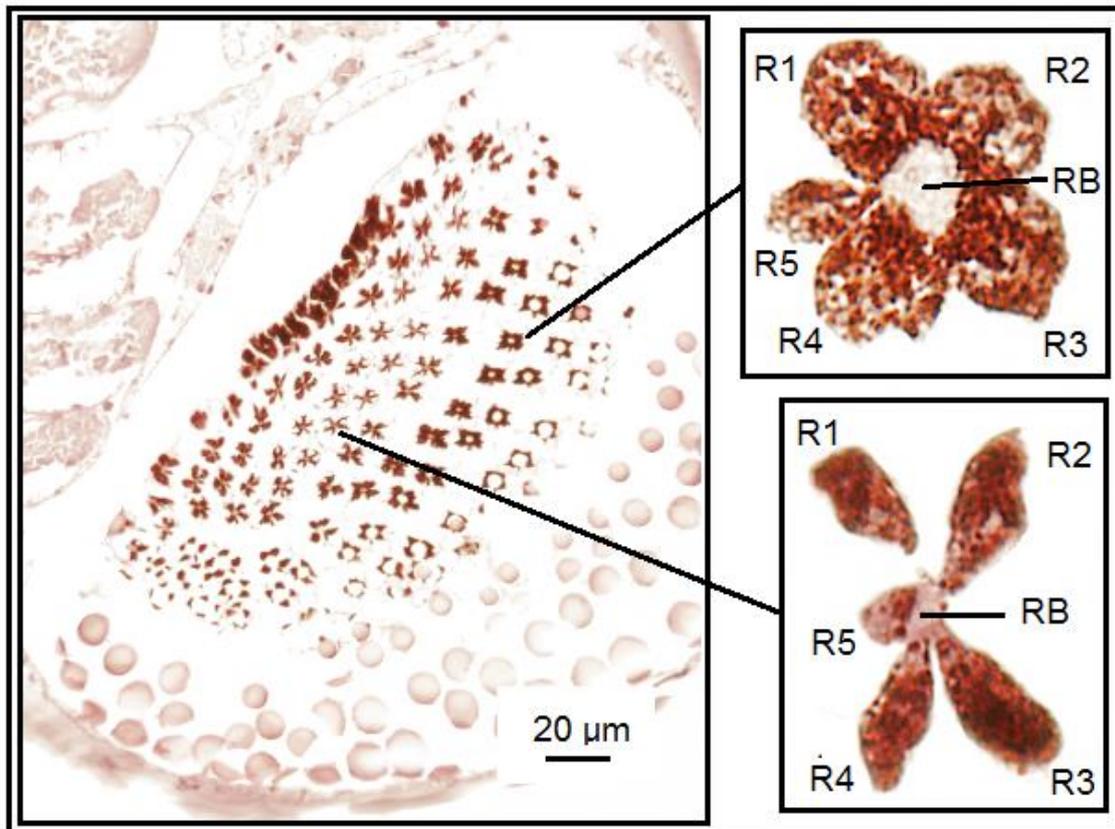


Figura 32. Corte longitudinal do olho do anfípode *A.brasiliensis*; onde podem ser observados os ommatídeos, cada um contendo cinco células retinulares (CR) com os grânulos de pigmento posicionadas ao redor do rabdoma (RB). Entre as células retinulares (R1 à R5) podemos observar a célula R5, de menos tamanho em relação as outras (Aumento, 20x).

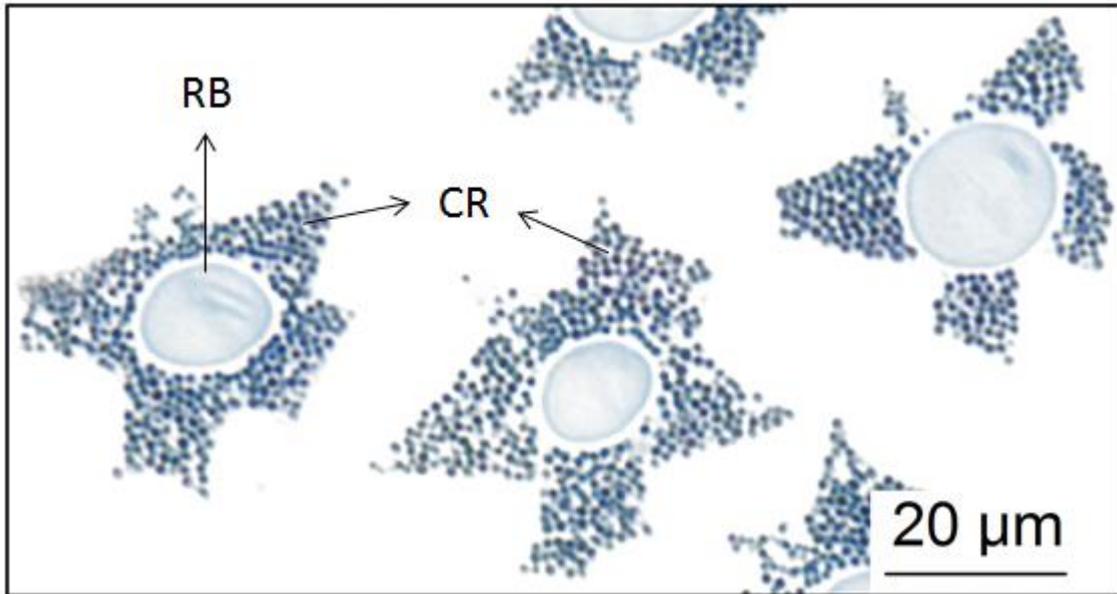


Figura 33. Corte longitudinal do olho do anfípode *A. brasiliensis*. Em destaque as cinco células retinulares (CR) ao redor do rabdoma (RB), de forma ligeiramente estrelada, com os grânulos de pigmentos (Aumento, 100x)

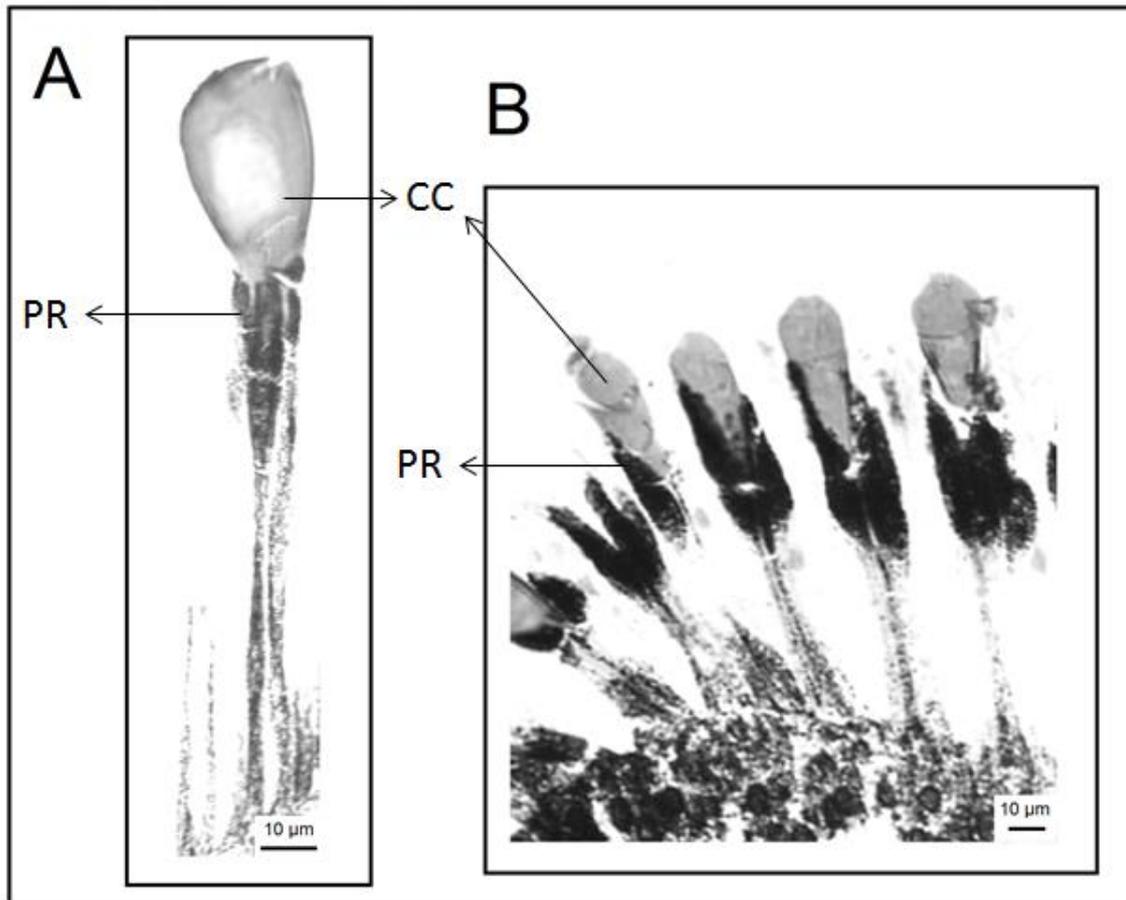


Figura 34. Corte transversal do omatídeo do anfípode *A. brasiliensis*. A) O pigmento refletor (PR) apresenta distribuição somente até a base do cone cristalino. B) Os pigmentos refletores (PR) encontram-se envolvendo o cone cristalino (CC) e sua base (escala 10 μm) (Aumento, 40x).

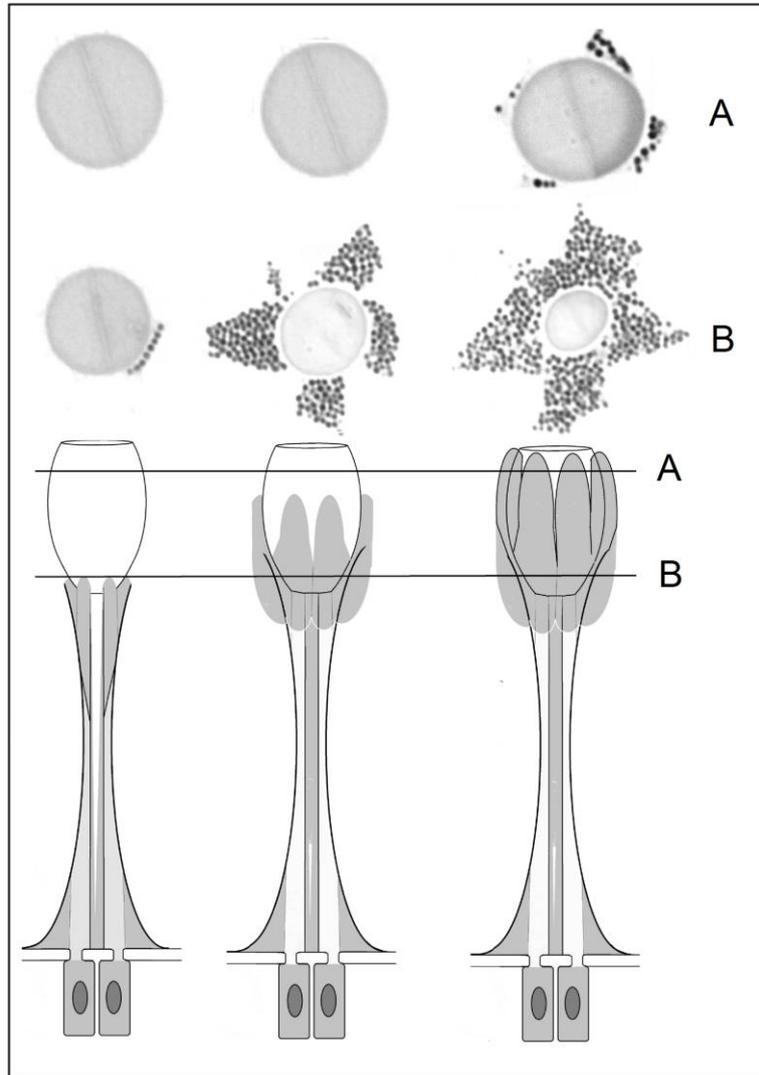


Figura 35. Esquema representando o omatídeo do olho de *A. brasiliensis*. (A) corte transversal da região mais distal das células do cone cristalino. (B) corte transversal da base do cone cristalino e início do rabdoma. É possível observar os diferentes níveis de extensão das células retinulares com seus pigmentos ao redor do rabdoma e do cone cristalino. Se sugere que o esquema da esquerda representa a posição dos pigmentos na região proximal dos omatídeos; e o esquema da direita quando externamente o omatídeo é visualizado com pigmento preto.

5 – DISCUSSÃO

Estrutura do olho de A. brasiliensis

Os crustáceos apresentam diversos tipos de olhos (Land e Nilsson, 2012), entre os quais se observa o olho composto aposicional. Os olhos de *A. brasiliensis* são extremamente similares ao tipo de olho composto aposicional, que também pode ser encontrado em insetos e chelicerados (Nilsson e Kelber, 2007). Dentre os quatro tipos de olho composto descrito por Hallberg et al. (1980), o anfípode *A. brasiliensis* se ajusta bem ao chamado “tipo gammarídeo”. Os elementos dióptricos de cada omatídeo consistem em uma hipoderme secretando uma cutícula sem lente, um cone cristalino piriforme formado por duas células do cone, e células acessórias que separam os omatídeos. São encontradas cinco células retinulares ao redor do rabdoma, estendendo-se através da membrana fenestrada, com seus respectivos núcleos localizados na região proximal do omatídeo. Segundo Hallberg et al. (1980), os anfípodas são os únicos crustáceos a apresentar uma hipoderme totalmente desenvolvida e uma lâmina basal.

Mezzetti e colaboradores (2007) encontraram diferenças no formato e no arranjo geral nos omatídeos do olho composto de duas espécies de anfípodas, *Talorchestia spinifera* (Mateus, 1962) e *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) representantes da família Talitridae. Os olhos de *T. saltator* apresentaram formato mais elíptico em relação a *T. spinifera*, e ambas as espécies apresentaram uma córnea cobrindo as unidades omatídicas do olho e compostas por uma porção de exoesqueleto totalmente transparente a luz. Nestas espécies a cutícula mostrou uma espessura de $12,40 \pm 0,98$ μm em *T. spinifera* e de $8,98 \pm 0,99$ μm em *T. saltator*. Em *Gammarus pulex* (Linné, 1758) observou-se uma cutícula com espessura de 7 μm e uma hipoderme de 4 μm (Hallberg et. al., 1980). No presente estudo encontramos para *A. brasiliensis* a cutícula variando entre 7,9 à 14,0 μm e a hipoderme podendo variar de 3,0 à 8,1 μm , o que mostra muita similaridade com as espessuras destas estruturas nas espécies de anfípodas citadas.

O arranjo estrelado das cinco células retinulares e as duas células do cone cristalino encontradas em *A. brasiliensis*, já foram descritas também em *Gammarus pulex*, *Orchestia gammarellus*, *Erichthonius difformis*, *Caprella loveni* e *C. nonocera* (Hallberg et.al., 1980), em *Pontoporeia affinis* (Rosemberg e Langer, 1995), e *Dulichia porecta* (Meyer-Rochow et.al., 1991; Oakley, 2003). Em relação ao tipo de pigmento

presente nas células retinulares, tem sido descritos para anfípodes os omocromos e os carotenoides (Hallberg et al., 1980). Beatty (1949) encontrou em *Gammarus pulex*, *Orchestia gammarella* e *Gammarus marinus* apenas pigmentos carotenoides em seus olhos. No entanto, os grânulos de pigmentos de coloração preta observados em *A. brasiliensis* levam a pensar que se trate de omocromos.

Distribuição dos padrões de pigmentação dos olhos ao longo do gradiente geográfico

A classificação realizada dos padrões de pigmentação do olho composto de *A. brasiliensis* em 5 categorias facilitou o estudo desta variação em vários níveis, permitindo observar algumas tendências deste fenômeno, ainda não podendo esclarecer este em sua totalidade. A primeira observação feita foi a ausência de alguma relação da frequência destes padrões com alguma variável geográfica que pudesse ser observada num gradiente norte-sul. Excluindo desta forma, a influência de alguma variável ambiental disposta neste gradiente, como por exemplo a temperatura da água do mar. Excluindo também, alguma componente genética de herança simples que dependa apenas do fluxo gênico para manter sua homogeneidade entre populações vizinhas ou que responda a um padrão de isolamento por distância, que geraria uma distribuição clinal não observada. A distribuição dos padrões não responde nem sequer as barreiras geográficas, mostrando similaridade entre populações separadas pelo Rio Macaé ou distantes quanto a praia de Cavaleiros e Mar do Norte (Rio das Ostras), sendo Cavaleiros muito diferente de sua vizinha praia Campista. A baixa dispersão observada em anfípodes devido a seu desenvolvimento direto (Lincoln, 1979), poderia explicar a ausência total de um padrão geográfico, já que a dispersão dos anfípodes acontece com restrições, ocorrendo na deriva aderidos a algas, troncos, ramas ou outros elementos levados pelas correntes. Em relação a isto, existem dados conflitantes na literatura para o talitrídeo *Talitrus saltator*. No Atlântico Norte, ainda com sua baixa dispersão, é possível detectar uma relação entre fluxo gênico e distância geográfica (Conceição, 1995) e no Mar Mediterrâneo, a espécie mostra grandes diferenças genéticas entre populações muito próximas (De Mathaeis et al., 1994). Ainda, supondo que *A. brasiliensis* fosse similar ao segundo caso, as grandes similaridades entre populações separadas por barreiras, sugerem uma independência total de uma questão genética simples, podendo se tratar mais provavelmente de um evento aleatório ou moderado por fatores estocásticos. Existe a possibilidade que estas populações estejam sob a

influência das atividades antrópicas nessas localidades, provocando extensiva diminuição das populações por causa: a) das atividades recreacionais, que incluem a ocupação das praias no verão e a limpeza das mesmas com tratores durante as épocas de alta temporada; b) empreendimentos como construção de orlas ou outras benfeitorias que terminam afetando às populações pela passagem de máquinas, acúmulo de entulhos nas áreas de praia, ou desaparecimento de linhas de vegetação do supramaré; c) pela instalação de luminárias de alta incidência luminosa que permanecem acesas durante a noite, certamente provocando um impacto na locomoção e atividades destes anfípodas, ou tornando eles mais suscetíveis a predação nestes horários nos quais são mais ativos que durante o dia. De fato, anfípodas da família Talitridae utilizam-se de pistas solar e lunar para se locomoverem nas praias, detectando os diferentes comprimentos de onda emitidos por estes (Scapini 2006; Ugolini et al., 2007, 2009; Mezzetti et al. 2010b; Ugolini 2014). O talitrídeo *T. saltator* quando submetido a luz do sol e a comprimentos de onda azuis, apresenta resposta em direção às mesmas, mostrando que utiliza claramente os diferentes gradientes de intensidade luminosa para se orientar e tomar a direção correta em seu ambiente natural (Ugolini et al., 2009). Isto sugere que excessiva luminosidade artificial instalada em praias certamente afetará a orientação espacial destes animais, com imprevisíveis consequências.

Distribuição dos padrões de pigmentação dos olhos ao longo do tempo

Ao analisar as variações dos padrões de pigmentação no tempo nas praias da barra das lagoas de Cabiúnas e Comprida, foram observados frequências de padrões muito similares entre elas para os anos avaliados (2012, 2014 e início de 2015), mostrando que estas populações são muito similares e submetidas a condições semelhantes. Desta forma, ambas praias mostraram uma grande flutuação da frequência dos padrões, seguindo as mesmas tendências e as variações observadas de um ano para outro. Durante 2012 (Outono a Primavera) a maior frequência observada foi do padrão 0 (100% pigmentado), sendo que na primavera também foram observados altos níveis do padrão 4 (< 25% de pigmentação). Em 2014 (Outono a Primavera) este padrão mudou para se tornarem os padrões 3 e 4 os mais frequentes, seguindo o padrão 0 uma tendência inversa à observada em 2012. No verão de 2015, novamente o padrão 0 (100%) tornou-se o mais frequente e no outono os padrões 3 e 4 voltam a ser os mais

frequentes. Estes resultados sugerem que as frequências dos padrões possam estar seguindo uma variação cíclica e sazonal.

Distribuição dos padrões de pigmentação dos olhos por gênero e por classe de tamanho

Quando a comparação é feita pelo sexo, nos períodos com alto número de indivíduos com olhos completamente pigmentados, se observa que tanto juvenis quanto fêmeas e machos apresentam um número alto de indivíduos com olho preto. Portanto, ainda não sendo similares as proporções entre os sexos, não há nenhum padrão relacionado especificamente a um dos sexos. As variações dos padrões com o tempo começam a ser melhor compreendidas quando são analisadas pelo tamanho dos indivíduos. O estudo ao longo do gradiente geográfico nas dez praias e o estudo da variação temporal para as praias da Cabiúnas e Comprida de *A. brasiliensis* mostraram uma forte tendência à diminuição do número de omatídeos pigmentados com o aumento do tamanho dos anfípodes. Ao estabelecer 4 classes de tamanhos para o anfípode entre os extremos de tamanhos registrados, observa-se claramente esta tendência. Até os 6 mm de comprimento, 87 % destes tem os olhos completamente pigmentados; entre 6 e 8,6 mm, esta fração baixa para 67%; entre 8,7 e 11,3 mm de comprimento, esta baixa para 40%; e somente 13% dos indivíduos maiores a 11,3 mm apresentam os olhos completamente pigmentados. Nos anos de 2012 e 2015 mais de 95% dos indivíduos abaixo de 4 mm apresentaram os olhos completamente pretos. No entanto, em 2014, essa fração foi menor a 25% nos indivíduos menores a 4 mm. Ainda assim, foi possível observar essa tendência diminuindo esta fração, e aumentando a proporção dos indivíduos com menos de 25% de omatídeos pigmentados no olho com o aumento do tamanho dos anfípodes.

A constatação desta tendência sugere que os padrões de pigmentação dos olhos seja um fenômeno individual, variando ao longo do desenvolvimento do indivíduo; ou um fenômeno a nível populacional, na medida que a população vai se tornando adulta. Em qualquer dos dois casos, seria difícil esperar mudanças no curto prazo, a não ser que submetidos a condições agudas.

Alteração dos padrões de pigmentação

Os diferentes padrões de pigmentação observados em *A. brasiliensis* estão determinados pela quantidade de omatídeos visualizados como pigmentados, quando observados externamente. O estudo histológico do olho composto desta espécie mostra a capacidade das células retinulares de se expandir e estender seus pigmentos além da base do cone cristalino. Então, enquanto uns omatídeos apresentam seus pigmentos restritos à extensão do rabdoma, outros apresentam estes estendidos até as regiões mais distais do cone cristalino. Portanto, aqueles observados como brancos externamente seriam os primeiros, e aqueles observados como pigmentados seriam os com o pigmento ao redor do cone cristalino. Isto sugere que há um certo grau de independência de um omatídeo para outro na capacidade de migração ou na quantidade dos pigmentos retinulares. Quando observados em cortes longitudinais, os omatídeos apresentaram variação de seu comprimento, sendo os mais longos os situados na região central do olho e os de menor tamanho aqueles encontrados nas extremidades do olho. Tal observação deve ser destacada uma vez que as diferenças no comprimento dos omatídeos podem refletir na capacidade das células retinulares alcançarem o cone cristalino mais facilmente. Por exemplo, nos indivíduos de padrão 4 (< 25% de omatídeos pigmentados), justamente os omatídeos que se observam pigmentados são aqueles situados nos extremos onde são encontrados os mais curtos.

Muitos estudos tem investigado as causas da migração dos pigmentos nas células retinulares dos olhos de crustáceos utilizando diferentes técnicas, como eletroretinogramas (ERG), microespectrofotometria (MSP), e análises histológicas (Donner et al., 1994; Meyer-Rochow 1999; 2001; Vargas et al., 2010). Segundo, Meyer-Rochow (2001), os crustáceos de maneira geral apresentam migração dos pigmentos distais controladas por hormônios, mas as migrações dos pigmentos proximais das células retinulares ocorrem como uma resposta direta a luz visível.

A ausência de variações nos padrões de pigmentação nos anfípodes *A. brasiliensis* submetidos a diferentes intensidades luminosas no fotoperíodo de 12h/12h dia/noite neste estudo sugerem que os padrões de pigmentação de fato não variam numa breve escala de tempo como uma resposta a um ciclo circadiano. Quando estes anfípodes foram submetidos a completa escuridão por 96h, 50% mostraram um incremento na quantidade de omatídeos pigmentados, passando para um nível superior de classificação do padrão de pigmentação. No entanto, esta resposta, precisa ainda ser confirmada com novos estudos.

Sabe-se também que alguns componentes dos olhos de crustáceos de fato podem ser alterados como respostas adaptativas a ambientes com ou sem luz (Meyer-Rochow, 1999) tais como: posição dos grânulos de pigmento, tamanho e a forma do rabdoma. No escuro geralmente abre-se o aparato dióptrico para permitir a captura de mais fótons, aumentando o diâmetro do rabdoma. Tais mudanças tem como objetivo permitir a maior entrada de luz sob condições de pouca luminosidade a fim de melhorar a captura de fótons (Hallberg e Elofsson, 1989; Meyer-Rochow et.al., 1990). Segundo Meyer Rochow (1999), há uma diferença na velocidade com que ocorrem as adaptações a claridade e ao escuro. Adaptações a luz são geralmente mais rápidas, não demorando mais que alguns minutos, já as adaptações ao escuro podem levar horas. Apesar destes fatos terem sido relatados para alguns grupos de crustáceos, especificamente em *A. brasiliensis* tais alterações não ocorreram em nenhum momento como podemos comprovar em relação ao tempo de exposição à luminosidade.

Outro fenômeno que tem sido frequentemente observado em animais e especialmente em crustáceos trata-se da migração de pigmentos por efeito de camuflagem como mecanismo de defesa ante potenciais predadores. Esta migração que pode ocorrer num breve intervalo de tempo, quando ocorre a nível da carapaça, pode-se manifestar gradualmente após mudas sucessivas, como observado no anomura da família Porcellanidae *Petrolistes mitra* (Dana, 1852) (Weber, 1991). No entanto, tratando-se de pigmentos retinulares de um olho composto, se espera que não seja necessário a ecdise para observar mudanças na migração dos pigmentos distais dada a transparência das células do cone cristalino. Sobre uma areia branca, organismos brancos com olhos completamente pretos podem resultar num alvo fácil para predadores como as aves. Então, a agregação proximal dos pigmentos na maioria dos ommatídeos pode ocorrer como um mecanismo de camuflagem.

Na avaliação de possíveis variações dos padrões de pigmentação de *A. brasiliensis* submetidos a fundo branco e fundo preto, foi constatado que não houve mudanças nos anfípodes alocados em fundo preto, mas nos alocados em fundo branco, 20% destes apresentaram variação para um padrão de um nível menor de pigmentação, sugerindo que talvez um efeito de camuflagem possa estar acontecendo. No entanto, este registro precisa ser confirmado com novas avaliações que permitam avaliar de forma menos subjetiva as variações dos padrões.

Influência da radiação ultravioleta nos padrões de pigmentação

A radiação ultravioleta pode induzir a dispersão de pigmentos nos melanóforos de crustáceos decápodos. Experimentos no caranguejo *Chasmagnathus granulata* tem mostrado a dispersão destes pigmentos em dose mínima de 0,42 J/cm² de UV-A e de 2,15 J/cm² de UV-B, mostrando uma resposta máxima quando expostos a 10,0 J/cm² de UV-A e a 8.6 J/cm² de UV-B. A radiação UV-A mostrou-se mais efetiva do que a radiação UV-B na indução da dispersão de pigmentos Gouveia et al. (2004) nestes crustáceos.

Ao contrário do que foi observado em *C. granulata*, os anfípodes não mostraram respostas sob exposição a radiação UV-B no tempo e dose avaliados, quanto ao padrão de pigmentação. A migração dos pigmentos ao redor do cone cristalino seria suficiente para a percepção da mudança de padrão de pigmentação no anfípode. No entanto, não pode ser descartado, que as doses e o tempo de exposição testados não tenham sido suficientes para produzir uma resposta no anfípode.

A radiação UV em altas doses pode causar diversos danos a animais silvestres e humanos (Kirchhoff et al. 2000). O aumento das taxas de radiação UV-B impactam organismos terrestres e aquáticos (Hader et al., 2007) e têm induzido a câncer em células humanas e células de peixes (Setlow et.al., 1989; Setlow, 2008). Também, tem sido relatados danos nas células e alterações significativas na defesa antioxidante do sistema visual de crustáceos, entretanto, estes efeitos são altamente dependentes do fotoperíodo ao qual estes animais estão expostos (Vargas et al., 2010).

O exoesqueleto dos crustáceos como camarões e caranguejos, no entanto, apresentam uma alta capacidade de bloquear a radiação UV. Nos caranguejos o exoesqueleto dorsal bloqueia 94.9 ± 1.7 % da UV-A, 96.4 ± 1.3% da UV-B e 100% da radiação UV-C. E nos camarões o exoesqueleto dorso-lateral bloqueia apenas 25% UV-A, 42.5% UV-B e 52.5% da radiação UV-C (Gouveia et.al., 2004). Os pigmentos das células retinulares atuam também como uma proteção aos efeitos danosos causados pela radiação UV.

Alteração dos padrões de pigmentação – um fenômeno individual?

Considerando que a alteração do padrão de pigmentação do olho de *A. brasiliensis* seja um fenômeno individual, que ocorre ao longo do desenvolvimento do

anfípode, pode-se estabelecer que todos nascem com os olhos pretos e que na medida de seu desenvolvimento e crescimento, estes vão diminuindo gradualmente o número de omatídeos pigmentados (com pigmento estendido até a região mais distal do cone cristalino). O que pode estar ocasionando esta perda? Diversas questões podem ser levantadas: a) produção de uma quantidade fixa de pigmentos retinulares quando juvenis, que com o crescimento se tornam insuficientes para pigmentar as regiões ao redor do cone cristalino; b) perda da elasticidade das células retinulares para a expansão de seu protoplasma por envelhecimento ou dano celular; c) interrupção de algum mecanismo molecular de sinalização que determina a produção, dispersão ou agregação de pigmentos como resposta a sinalizadores externos (Milograna, 2010) ou d) ausência ou baixa dose de algum componente essencial, obtido normalmente da dieta, necessário a qualquer dos mecanismos citados.

A diminuição observada em 2012, do outono à primavera para os indivíduos completamente pigmentados estaria relacionado ao crescimento dos indivíduos, aumentando por tanto proporcionalmente os indivíduos com menos omatídeos pigmentados. Em 2014, o baixo número de juvenis completamente pigmentados menores a 4 mm, manteve baixa esta frequência do outono até primavera, a qual retornou a ser alta no verão de 2015 com a presença de mais de 95% dos juvenis menores a 4 mm com olho completamente pigmentado. Ante esta situação se levantou a possibilidade de se tratar de um dano ocasionado pelo tempo de exposição dos anfípodas a intensidades elevadas de radiação UV após sua eclosão, principalmente durante os primeiros estágios de seu desenvolvimento como juvenil. No entanto, a baixa proporção de indivíduos com olhos completamente pigmentados e menores a 4 mm de comprimento encontrados em 2014, pode sugerir que a diminuição dos omatídeos pigmentados possa se iniciar muito mais cedo sob certas circunstâncias ou que existe outro fator capaz de alterar esta situação. A falta de correlação entre as radiações com a frequência dos padrões de pigmentação, podem ser explicadas em parte pela situação contrastante encontrada em 2014 e porque provavelmente se há uma influência, esta ocorre principalmente no início do desenvolvimento dos indivíduos.

Alteração dos padrões de pigmentação – um fenômeno populacional?

A diminuição dos indivíduos com padrão completamente pigmentado como fenômeno a nível populacional requer que inicialmente todos os padrões estejam

presentes igualmente representados e geneticamente determinados. Os fatores seletivos capazes de alterar estas proporções podem levar estes padrões com o tempo a diferentes proporções dependendo de qual é a pressão seletiva atuante num determinado local e tempo; e de qual será a influência do fluxo gênico num determinado momento. Se este for o caso, a predação por aves pode ser o modulador seletivo.

No entanto, esta hipótese parece pouco provável, pois não explica como geneticamente pode ocorrer a variação de um omatídeo para outro. Se as variações são determinadas por diferenças nas quantidades de pigmentos, especialmente naqueles padrões onde a distribuição dos omatídeos pigmentados parece aleatória, um fenômeno epigenético como da variegação por efeito de posição (PEV) que ocorre em *Drosophila* (Wakimoto, 1998) é mais provável.

Todas as possíveis causas aqui citadas da diminuição dos omatídeos pigmentados com o tamanho do anfípode poderão ser avaliadas futuramente, pois as evidências geradas neste estudo não permitem tirar conclusões a esse respeito.

6. REFERÊNCIAS

- Anzalone, C.R.; Kats, L.B.; Gordon, M.S. (1998). Effects of solar UV-B radiation on embryonic development in *Hyla cadaverina*, *Hyla regilla* and *Taricha torosa*. *Conservation Biology*, 12(3): 646-653.
- Barnes, W.J.P. e Nalbach, H.O. (1993). Eye movements in freely moving crabs: their sensory basis and possible role in flow-field analysis. *Comp. Biochemistry. Physiology. A* 104, 675-693.
- Barnes, W. J.; Johnson, A.; Horseman, G. e Macauley, M. (2002). Computer- aided studies of vision in crabs. *Marine. Freshwater. Behaviour. Physiology*. 35, 37-56.
- Beatty, R. (1949.) The pigmentation of cavernicolous animals. *Journal of Experimental Biology*. 26(2): 125-130
- Blanke, H.; Nalbach, O. H. e Varju, D. (1997). Whole-field integration, not detailed analysis, is used by the crab optokinetic system to separate rotation and translation in optic flow. *Journal of Comparative Physiol. A* 181, 383-392
- Cardoso, R.S. (2002). Behavioural strategies and surface activity of the sandhopper *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) on a Brazilian beach, *Marine Biology* 141: 167–173.
- Cardoso, R.S.; Veloso, V.G. (1996). Population biology and secondary production of the sandhopper *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) at Prainha beach, *Brazilian Marine Ecology Progress Ser.*, 142: 111-119.
- Conceição, M.B. (1995) Genetic Investigations of Talitrid Amphipods. Ph.D. Thesis. Isle of Man, Liverpool University, p:145.
- Cohen, J. e Frank, T. (2006). Visual Physiology of the Antarctic Amphipod *Abyssorchomene plebs*. *Biological Bulletin*. 211(2): 140-148.
- Cohen, J.; Cronin, T.; Lessios, N.; Forward, R.B. (2010). Visual physiology underlying orientation and diel behavior in the sand beach amphipod *Talorchestia longicornis*. *The Journal of experimental biology*. 213: 3843-3851
- Colombini, I.; Aloia, A.; Fallaci, M.; Pezzolli, G.; Chelazzi, L. (2000). Temporal and spatial use of stranded wrack by the macrofauna of a tropical sandy beach. *Marine Biology*, 136: 531–541.

- Connolly, S.J.; Moeller, R.E.; Sanchez, G. e Mitchell, D.L. (2009). Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV Radiation. *Photochemistry Photobiology*, 85: 144-152.
- Cronin, T.W.; Marshall, N.J.; Quinn, C.A.; King, C.A. (1994). Ultraviolet photoreception in mantis shrimp. *Vision Research*. 34(11): 1443–1452.
- Defeo, O.; McLachlan, A.; Schoeman, D.S.; Schlacher, T.A.; Dugan, J.; Jones, A.; Lastra, M. & Scapini, F. (2009). Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81: 1-12.
- De Mathaeis, E.; Cobolli, M.S.; Mattoccia, M.; Saccoccio, P. e Scapini, F. (1994). Genetic divergence between natural populations of Mediterranean sandhoppers (Crustacea, Amphipoda). Em: Beaumont, A.R. (ed.) *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. London, Chapman & Hall.
- Donner, K.O.; Langer, H.; Lindström, M.; Schlecht, P. (1994). Visual pigment, dark adaptation and rhodopsin renewal in the eye of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda). *Journal of Comparative Biology A*. 174(4): 451-459
- Fernald, R.D. (2000) Evolution of eyes. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 444–450.
- Filgueira, D.M.V.B.; Guterres, L.P.; Votto, A.P.S.; Vargas, M.A.; Boyle, R.T.; Trindade, G.S. & Nery, L.E.M. (2010). Nitric Oxide-dependent pigment migration induced by ultraviolet radiation in retinal pigment cells of the crab *Neohelice granulata*. *Photochemistry Photobiology*, 86: 1278-1284.
- Forward, R.; Bourla, M.; Lessios, N.N.; Cohen, J.H. (2009). Orientation to shorelines by the supratidal amphipod *Talorchestia longicornis*: Wavelength specific behavior during sun compass orientation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 376(2); 102-109.
- Gómez, J.; Defeo, O. (1999). Life history of the sandhopper *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda) in sandy beaches with contrasting morphodynamics. *Mar. Ecology. Progress. Ser.*, 182: 209-220.
- Gouveia, G.R.; Lopes, T.M.; Neves, C.A.; Nery, L.E.M. & Trindade, G.S. (2004). Ultraviolet radiation induces dose-dependent pigment dispersion in crustacean chromatophores. *Pigment Cell Res*, 17: 545-548.
- Gouveia, G.R.; Marques, D.S.; Cruz, B.P.; Geracitano, L.A.; Nery, L.E.M. & Trindade, G.S. (2005). Antioxidant defences and DNA damage induced by UV-A and UV-B

- radiation in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochemistry Photobiology*, 81: 398-403.
- Hallberg, E.; Nilsson, H. L.; Elofsson, R. (1980). Classification of Amphipod Compound Eyes - the Fine Structure of the Ommatidial Units (Crustacea, Amphipoda) *Zoomorphologie* 94, 279-306.
- Hallberg, E. e Elofsson, R. (1989). Construction of the pigment shield of the crustacean compound eye: a review. *Journal of Crustacean Biology* 9: 359–372
- Häder, D.P.; Kumar, H.D.; Smith, R.C. e Worrest, R.C. (2007). Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6, 267–285.
- Herring PJ, Roe HSJ (1988). The photoecology of pelagic oceanic decapods. *Symposium of the Zoological Society of London* 59: 263–290
- Huebner, J.D.; Loadman, N.L.; Wiegand, M.D.; Young, D.L.W. & Warszcki. L-A. (2009). The effect of chronic exposure to artificial UVB radiation on the survival and reproduction of *Daphnia magna* across two generations. *Photochemistry. Photobiology*, 85:374-378.
- ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (2014) <http://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/>, visitado no dia 25/06/2014.
- Kane, R. P. (1998). Ozone depletion, related uvb changes and increased skin cancer incidence. *International Journal of Climatology*, v. 18, p. 457-472.
- Kirchhoff, V.W.J.H.; Echer, E.; Leme, N.P.; Silva, A.A. (2000). A Variação Sazonal da Radiação Ultravioleta Solar Biologicamente Ativa. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(1).
- Kirchhoff, V.W.J.H. (1995). *Ozônio e Radiação UV-B*, Transtec Editorial, São José dos Campos, 149p.
- Land, M.F. (1981a). Optics and vision in invertebrates. In: *Handbook of sensory physiology*. (ed. Autrum, H.), Springer Berlin Vol. VII/6B. p 471-592.
- Land, M.F. e Nilsson D.E. (2012). *Animal Eyes*. Segunda edição, Oxford University Press. p: 271.
- Lincoln, R.J. (1979). *British Marine Amphipoda: Gammaridea*. British Museum (Natural History). London, Northumberland Press Ltd., 658 p.
- McCullough, E.C.; Porter, W.P. (1971) Computing clear day solar radiation spectra for the terrestrial ecological environment. *Ecology*, 52(6): 1008-1015.

- Meyer-Rochow, V.B. (1989) A re-investigation and re-interpretation of the cumacean photoreceptor. *Zoologica Scripta* 18(2): 283-288.
- Meyer-Rochow, V.B.; Towers, D.; Ziedins, I. (1990) Growth patterns in the eye of *Petrolisthes elongatus*. *Experimental Biology* 48: 329–340.
- Meyer-Rochow, V.B.; Stephan, H.; Sulochana, D. (1991) Morphological and anatomical observations on the hairy eyes of males and females of the marine amphipod *dulichia porrecta*(crustacea, amphipoda, podoceridae). *Bolletino di zoologia*, 58(1):59-69.
- Meyer-Rochow, V.B. (1999) Compound eye: circadian rhythmicity, illumination, and obscurity. In: ed by E Eguchi, Y Tominaga, *Atlas of arthropod sensory receptors*. Springer, Tokyo, Berlin, New York, p: 97–124.
- Meyer-Rochow, V.B. (2001) The Crustacean Eye: Dark/ Light Adaptation, Polarization Sensitivity, Flicker Fusion Frequency, and Photoreceptor Damage. *Zoological Science*, 18(9): 1175-1197.
- Mezzetti, M.C.; Gambineri, S.; Rossano, C.; Scapini, F. (2010a) Visual ecology of talitrid amphipods from Mediterranean and Atlantic coasts. *Zoologica baetica*, 21: 55-63.
- Mezzetti, M.C.; Gambineri, S.; Scapini, F. (2010b) The eyes of two talitrid amphipods: differences in structure may reflect different behaviours. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 43(2): 127-133
- Meyer-Rochow, V.B. (2014) Compound eyes of insects and crustaceans: Some examples that show there is still a lot of work left to be done. *Insect Science*. 22(3): 461-481.
- Mezzetti, M.C.; Nardi, M.; Scapini, F. (1997) Variation and ontogeny of the response to visual stimuli in Mediterranean populations of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea- Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 211: 129-142
- Michel, A. e Anders, F. (1954) Über die Pigmente im Auge von *Gammarus pulex* L. (Crust., Amphipod.). *Naturwissenschaften* 41:72.
- Milograna, S.R. (2010). A translocação pigmentar em cromatóforos ovarianos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda): do receptor aos motores moleculares. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Riberão Preto. 116 p.

- Muller, H.J. (1930) Types of visible variations induced by X-ray in *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 22: 299-334.
- Nilsson, D. e Kelber, A. (2007) A functional analysis of compound eye evolution. *Arthropod Structure and Development*. 36(4): 373-385.
- Oakley, T. (2003) On homology of arthropod compound eyes. *Integrative and comparative biology*. 43(4): 522-530
- Papi, F.; Pardi, L. (1953) Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda). II Sui fattori che regolano la variazione dell'angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte. L'orientamento diurno di altre popolazioni. *Zeit. vergl. Physiol.* 35:490–518.
- Pardi, L.; Papi, F. (1952) Die Sonne als Kompass bei *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda-Talitridae). *Naturwissenschaften* 39:262–263.
- Rosa, L.C.; Aloizio, R; Borzone, C.A. (2007) Talitridae (Amphipoda, Crustacea) nas praias estuarinas da baía de paranaguá, sul do Brasil: distribuição especial e abundância.. *Brazilian Journal Aquatic Science Technology*. 11(1):37-41.
- Rosenberg, J; H. Langer. (1995) Ultrastructure of the compound eyes of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda) and effects of light on their fine structure. *Zoology-Analysis of Complex Systems* 99:138–150.
- Rossano, C.; Gambineri, S.; Fanini, L; Durier, V.; Rivault, C.; Scapini, F. (2009) Behavioural adaptations in talitrids from two Atlantic beaches. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 85(4): 573-584.
- Salvini-Plawen, L.V.; Mayr, E. (1977) On the evolution of photoreceptors and eyes. *Evolution Biology*, 10:207-263.
- Scapini, F.; Dugan, J. (2008) Sun and landscape orientation in adult and juvenile sandhoppers *Orchestoidea tuberculata* (Amphipoda, Talitridae) from two beaches in south central Chile. *Marine Ecology*. 29(1): 19-27
- Scapini, F. (2006) Keynote papers on sandhopper orientation and navigation. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 39(1): 73-85
- Serejo, C.S. (2004) Talitridae (Amphipoda, Gammaridea) from the Brazilian coastline. *Zootaxa*. 646: 1–29.
- Setlow, R.B. (2008) Solar radiation and induction of DNA damages, mutations and skin cancers. *Solar radiation and human health* (ed. by Bjertness),. The Norwegian Academy of Sciences and Letters, Oslo. p. 137–146

- Setlow, R.; Woodhead, A. e Grist, E. (1989) Animal model for ultraviolet radiation-induced melanoma: platyfish–swordtail hybrid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 8922–8926.
- Seum, C.; Spierer, A.; Pauli, D.; Szidonya, J.; Reuter, G, & Spierer, P. (1996) Position-effect variegation in *Drosophila* depends on the dose of the gene encoding the E2F transcriptional activator and cell cycle regulator. *Development*, 122:1949-1956.
- Short, A.D. (1999) *Handbook of beach and shoreface morphodynamics*. Chinchester, John Wiley & Sons, 491p.
- Suguo, K. (1973) *Introdução à Sedimentologia*. EDUSP, São Paulo, 312p.
- Ugolini, A.; Castellini, C.; Mercatelli, L. (2007) Moon orientation on moonless nights. *Animal Behaviour*. 73(3): 453-456
- Ungherese, G.; Ugolini, A. (2009) Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination. *Environmental Pollution*. 157(4): 1360-1364
- Ugolini, A.; Perra, G.; Focardi, S.; Somigli, S.; Martellini, T.; Cincinelli, A. (2012) Sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) as a bioindicator of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 89(6): 1272-1276
- Ugolini, A. (2014) Optic flow and sea-land orientation in the sandhopper *Talitrus saltator*. *The Journal of Experimental Biology*. 217: 2041-2043.
- Vargas, M.A.; Geish, M.A.; Maciel, F.E.; Cruz, B.P.; Filgueira, D.M.V.B.; Ferreira, G.J.; Nery, L.E.M.; Allodi, S. (2010) Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 151(3): 343-350
- Veloso, V.G.; Sallorenzo, I.A.; Ferreira, B.C.; de Souza, G.N. (2009) *Atlantorchestoidea brasiliensis* (Crustacea: Amphipoda) as an indicator of disturbance caused by urbanization of a beach ecosystem. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58: 13-21.
- Veloso, V.G.; Neves, G.; Lozano, M.; Perez-Hurtado, A.; Gago, C.G.; Hortas, F.; Garcia Garcia, F. (2008) Responses of talitrid amphipods to a gradient of recreational pressure caused by beach urbanization. *Marine Ecology*. 29: 126-133.
- Wakimoto, B. (1998) Beyond the nucleosome: Epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell*, 93:321-324.

- Weber, L.I. (1991). Sinonimia y caracterización de *Liopetrolisthes mitra* (Dana, 1852) y *Liopetrolisthes patagonicus* (Cunningham, 1871) N. Comb. Gayana Zoologia, 55(1): 13-22.
- Williamson, D.I. (1951) Studies on the biology of Talitridae (Crustacea, Amphipoda): Visual orientation of *Talitrus saltator*. Journal of Marine Biology Ass. 30:91-99
- Wright, L.D.; Short, A.D., (1984) Morphodynamic variability of surf zones and beaches: a synthesis. Marine Geology, 56, 93-118.
- Zar, J.H. (1984) Biostatistical analysis. 2nd. ed. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall, 718 p.
- Zeil, J. e Hemmi, J.M. (2006) The visual ecology of fiddler crabs. Journal of Comparative Physiology. A 192: 1-25.

7. ANEXOS

Anexo 1. Resultados do teste de normalidade de Komolgorov-smirnov para a distribuição dos padrões de pigmentação de *A. brasiliensis*.

Praia	QM	CP	CO	CB	BA	FR	CA	CV	RA	MN
D	0,4800	0,2360	0,5350	0,3430	0,2490	0,3740	0,2950	0,5401	0,2354	-
	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	-

Anexo 2. Tabela de contingencia do Chi-quadrado sobre a independência dos padrões de pigmentação das praias, onde podemos encontrar a quantidade de indivíduos observados, seguida do valor esperado.

População		Padrão					Total
		0	1	2	3	4	
QM	Observado	41	4	1	4	0	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
CP	Observado	17	1	7	15	10	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
CO	Observado	95	3	2	0	0	100
	Esperado	61,95	3,7	7	15,4	2,4	
CB	Observado	55	6	8	19	12	100
	Esperado	61,95	3,7	7	15,4	2,4	
BA	Observado	18	1	4	13	14	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
FR	Observado	31	4	4	6	5	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
CA	Observado	12	0	7	21	10	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
CV	Observado	48	2	0	0	0	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
MN	Observado	44	0	0	0	0	44
	Esperado	27,25	1,629	3,1	6,8	5,1	
RA	Observado	7	1	9	14	19	50
	Esperado	30,97	1,851	3,53	7,7	5,8	
Total		368	22	42	92	70	594

Anexo 3. Tabela de contingência do Chi-quadrado sobre a independência dos padrões de pigmentação nos diferentes estados de desenvolvimento e sexos (J) juvenis, (F) fêmeas, e (M) machos de anfípodas provenientes a praia da Comprida.

Sexo		Padrão de pigmentação					Total
		0	1	2	3	4	
J	Observado	61	4	1	4	4	74
	Esperado	35,13	2,46	6,13	8,46	21,79	
F	Observado	330	26	65	84	182	687
	Esperado	326,14	22,92	56,97	78,58	202,36	
M	Observado	107	5	21	32	123	288
	Esperado	136,72	9,60	23,88	32,94	84,93	
Total		498	35	87	120	309	1049

Anexo 4. Tabela de contingência do Chi-quadrado sobre a independência dos padrões de pigmentação nos diferentes estados de desenvolvimento e os sexos. (J) juvenis, (F) fêmeas, e (M) machos de anfípodas provenientes da praia da Cabiúnas.

Sexo		Padrão de pigmentação					Total
		0	1	2	3	4	
J	Observado	75	4	4	3	6	92
	Esperado	34,21	2,9	6,94	16,94	30,94	
F	Observado	204	19	44	113	180	560
	Esperado	208,23	17,94	42,28	103,15	188,37	
M	Observado	46	5	18	45	108	222
	Esperado	82,55	7,11	16,76	40,89	74,67	
Total		325	28	66	161	294	874

Anexo 5. Correlação de Spearman, das frequências dos padrões de pigmentação dos olhos de *A. brasiliensis* nas praias de Cabiúnas e Comprida

Spearman rank order correlations (Frequencias Cabiúnas e Comprida)							
MD pairwise deleted							
Correlações marcadas são significantes quando $p < 0,05$							
Variável	Freq 0	Freq 1	Freq 2	Freq 3	Freq 4	UV max	UV med
Freq 0	1,000000	-0,349558	-0,683862	-0,928519	-0,664212	0,171727	0,233904
Freq 1	-0,349558	1,000000	0,299631	0,450923	-0,025811	0,652340	0,607862
Freq 2	-0,683862	0,299631	1,000000	0,542035	0,409727	-0,160002	-0,189632
Freq 3	-0,928519	0,450923	0,542035	1,000000	0,509949	0,023704	-0,068149
Freq 4	-0,664212	-0,025811	0,409727	0,509949	1,000000	-0,455965	-0,414513
UV max	0,171727	0,652340	-0,160002	0,023704	-0,455965	1,000000	0,976190
UV med	0,233904	0,607862	-0,189632	-0,068149	-0,414513	0,0976190	1,000000

Anexo 6. Padrões de pigmentação observados no bioensaio 4 de 96 h de duração.

Padrões de pigmentação				
Grupo	Individuo	Inicial _i	Final	Após fixação em Pf 4%
1	1	3	-	0
	2	2	-	0
	3	3	-	0
	4	2	-	0
	5	3	-	0
	6	2	-	0
	7	4	-	0
	8	3	-	0
	9	3	-	0
	10	3	-	0
2	1	2	2	2
	2	2	2	2
	3	2	2	2
	4	2	2	2
	5	2	2	2
	6	2	2	2
	7	2	2	2
	8	2	2	2
	9	2	2	2
	10	2	2	2
3	1	3	3	3
	2	3	3	3
	3	3	3	3
	4	3	3	3
	5	4	3	3
	6	3	3	3
	7	3	2	2
	8	3	2	2
	9	3	2	2
	10	3	2	2

Anexo 7. Padrões de pigmentação durante o bioensaio 9 dos anfípodas na avaliação do efeito do fundo preto.

Anfípodas e seus padrões de pigmentação											
	Horário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	14h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	20h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
2° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	14h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	20h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
3° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	14h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	20h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
4° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	14h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	20h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
5° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	14h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	20h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
6° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	4
	14h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	X
	20h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	-
7° dia	8h	3	3	3	3	3	3	3	4	3	-
	14h	3	X	3	3	3	3	3	4	3	-
	20h	3	-	3	3	3	3	3	4	3	-
8° dia	8h	3	-	3	X	3	3	3	4	3	-
	14h	3	-	3	-	X	3	3	4	3	-
	20h	3	-	3	-	-	3	3	4	3	-
9° dia	8h	3	-	3	-	-	3	3	X	3	-
	14h	3	-	X	-	-	3	3	-	3	-
	20h	3	-	-	-	-	3	3	-	3	-

Anexo 8. Padrões de pigmentação dos anfípodos submetidos a iluminação constante em recipiente de fundo branco.

Anfípodos e seus padrões de pigmentação											
	Horário	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1° dia	8 h	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3
	14h	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3
	20h	3	4	3	4	3	3	3	3	3	4
2° dia	8h	3	4	3	4	3	3	3	3	3	4
	14h	3	4	3	4	3	3	3	3	3	4
	20h	3	4	3	4	3	3	3	3	3	4
3° dia	8h	X	4	3	4	4	3	4	3	3	4
	14h	-	4	3	4	4	3	4	3	3	4
	20h	-	4	3	4	4	3	4	3	3	4
4° dia	8h	-	X	3	4	4	3	4	3	3	4
	14h	-		3	4	4	3	4	3	3	4
	20h	-	-	3	4	4	3	4	3	3	4
5° dia	8h	-	-	3	4	4	3	4	3	3	4
	14h	-	-	3	X	4	3	4	3	3	4
	20h	-	-	3	-	4	3	4	3	3	4
6° dia	8h	-	-	3	-	4	3	4	3	3	X
	14h	-	-	3	-	4	X	4	3	3	-
	20h	-	-	3	-	4	-	4	3	3	-
7° dia	8h	-	-	3	-	4	-	4	X	3	-
	14h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
	20h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
8° dia	8h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
	14h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
	20h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
9° dia	8h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
	14h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-
	20h	-	-	3	-	4	-	4	-	3	-