
Licia Sales Oliveira

Seleção sexual em hermafroditas simultâneos:
lesmas marinhas como organismos-modelo

Sexual selection in simultaneous
hermaphrodites: sea slugs as model organisms



Foto: A. E. Migotto

São Paulo

2019

Licia Sales Oliveira

Seleção sexual em hermafroditas simultâneos:
lesmas marinhas como organismos-modelo

Sexual selection in simultaneous
hermaphrodites: sea slugs as model organisms

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor(a) em Ciências
Biológicas, na Área de Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
A. R. Marian

São Paulo

2019

Índice

Introdução Geral	01
Capítulo 1. Functional morphology of the sperm-containing chambers of the reproductive system of <i>Okenia polycerelloides</i> (Ortea & Bouchet, 1983).....	15
Capítulo 2. Sperm transfer, storage and digestion in a sea slug: towards understanding post-copulatory sexual selection mechanisms in simultaneous hermaphrodites.....	46
Capítulo 3. Love will tear us apart: traumatic mating through consumption of body parts in a sea slug.....	78
Considerações finais	87
Resumo	91
Abstract	92

Introdução Geral

Seleção Sexual – Uma breve introdução

A teoria da seleção sexual pressupõe que caracteres que elevem o sucesso reprodutivo dos indivíduos são selecionados durante o processo evolutivo, mesmo que, em algumas situações, estes caracteres se mostrem custosos em termos de viabilidade e sobrevivência (Andersson 1994). Essa teoria foi originalmente proposta por Darwin (1859) para explicar como caracteres masculinos extravagantes poderiam ter evoluído, uma vez que eles iam de encontro à teoria de evolução por seleção natural, pois reduziriam a sobrevivência dos indivíduos. De acordo com Darwin (1874), a seleção sexual seria decorrente de dois processos: 1) competição entre indivíduos do mesmo sexo (geralmente machos) por indivíduos do sexo oposto (geralmente fêmeas) e 2) seleção criteriosa de parceiros, geralmente realizada pelas fêmeas. Esses processos denominam-se seleção intrasexual e intersexual, respectivamente. Entretanto, tal abordagem de Darwin contemplava apenas eventos pré-copulatórios de seleção sexual, ou seja, o que ocorre antes da cópula e é relativo à aquisição de parceiros, pois ainda não havia evidências de que essa seleção poderia continuar mesmo após esses eventos (Eberhard 2009).

Somente após o trabalho de Parker (1970), os biólogos evolucionistas passaram a reconhecer a importância dos processos que ocorrem após o início da cópula, convencionalmente chamados de processos pós-copulatórios (Eberhard 2009). Existem equivalentes pós-copulatórios para ambos os processos de seleção intra e intersexual pré-copulatória propostos por Darwin (Eberhard 2009). O mecanismo pós-copulatório de seleção intrasexual seria a competição espermática, que é a disputa entre os espermatozoides de dois ou mais machos pela fertilização de um dado conjunto de ovócitos (Parker 1970). Por sua vez, um mecanismo pós-copulatório de seleção intersexual seria a escolha críptica da fêmea (ECF) (Eberhard 2009). Esta ocorre quando há influência da fêmea favorecendo a utilização dos gametas de um ou mais machos em detrimento de outros (e.g., rejeição, incapacitação ou digestão de esperma) (Eberhard 1996).

Seleção Sexual em hermafroditas

Muito do conhecimento existente sobre seleção sexual em animais decorre de

uma extensa pesquisa com espécies dioicas (Andersson 1994), isto é, organismos que possuem sexos separados em indivíduos diferentes. Isso se deve em parte à antiga e equivocada concepção de que não ocorreria seleção sexual em animais hermafroditas, também chamados de monoicos (Angeloni et al. 2003). Hermafroditas são indivíduos capazes de produzir ambos os gametas femininos e masculinos durante suas vidas (Avisé 2011). De fato, Darwin (1871) considerou que a seleção sexual seria incompatível com o hermafroditismo, pois uma vez sendo hermafrodita, não haveria evolução de caracteres sexuais secundários (e.g., estruturas para competição entre machos e dimorfismo sexual) que elevassem o sucesso reprodutivo dos indivíduos. Entretanto, essa visão inicial foi se modificando no decorrer do tempo e, nas últimas três décadas, o estudo da seleção sexual em hermafroditas tem se mostrado como um campo em crescimento (Leonard 2013).

O hermafroditismo é amplamente distribuído entre diversos grupos de animais terrestres e aquáticos, com alguns clados de invertebrados sendo compostos predominantemente ou exclusivamente por espécies monoicas, tais como esponjas, anêmonas, corais, minhocas, sanguessugas, briozoários, caramujos pulmonados e lesmas-do-mar (Baur 1998; Michiels 1998). É possível distinguir dois tipos principais de hermafroditismo: sequencial e simultâneo. Hermafroditas sequenciais são indivíduos que iniciam o ciclo de vida com um sexo e mudam para o outro posteriormente, ex., corais, alguns peixes e poliquetas (Michiels 1998). Em algumas espécies, é possível ocorrer ainda alternância na mudança dos sexos (e.g., Kuwamura et al. 1994; Nakashima et al. 1995). Hermafroditas sequenciais são relativamente bem estudados e a maioria dos trabalhos realizados com esses animais tem tentando compreender os mecanismos envolvidos na mudança do sexo, bem como as condições em que seria mais vantajoso mudar para o sexo masculino ou feminino (Michiels 1998). Por sua vez, hermafroditas simultâneos, que serão o foco desta introdução, são organismos que possuem sistemas reprodutores masculino e feminino funcionais simultaneamente durante a maior parte de seu ciclo de vida, e cujo ato de reprodução geralmente envolve tanto a função feminina quanto a masculina de cada indivíduo (Michiels 1998). Como exemplos desse segundo tipo podemos citar lesmas marinhas e terrestres, caramujos, alguns platelmintos, entre outros (e.g., Haase & Karlsson 2004; Koene 2006; Janicke et al. 2016).

Inicialmente, foi sugerido que a seleção sexual em hermafroditas simultâneos

seria mais fraca quando comparada àquela presente em organismos dioicos (e.g., Morgan 1994; Greeff & Michiels 1999a). Entretanto, atualmente é amplamente reconhecido que a seleção sexual também pode operar de forma intensa nestes hermafroditas (e.g., Charnov 1979; Michiels 1998; Anthes 2010; Schärer et al. 2015). Devido ao fato de que muitas espécies monoicas são promíscuas e têm capacidade de armazenamento de esperma, elas são afetadas por pressões similares àquelas que influenciam a evolução das estratégias de acasalamento e competição espermática observadas em espécies dioicas (Charnov 1996; Baur 1998; Michiels 1998).

Escolha do parceiro em hermafroditas simultâneos

Ao contrário do proposto em trabalhos mais antigos, os quais consideravam que mecanismos pré-copulatórios de seleção sexual seriam apenas fracamente expressados em hermafroditas simultâneos (e.g., Greeff & Michiels 1999a), trabalhos mais recentes indicam que pode haver escolha criteriosa de parceiros nesses animais (Anthes 2010). Apesar da alta frequência de cópula ser comum (e.g., Angeloni & Bradbury 1999) e dar a impressão de interações sexuais indiscriminadas, isso por si só não prova ausência de escolha criteriosa de parceiros em animais monoicos. Nesses organismos, tal escolha pode incluir uma sofisticada discriminação baseada no tamanho do corpo, histórico de cópula e parentesco (Anthes 2010).

O tamanho corporal pode influenciar os recursos disponíveis para a reprodução e estar positivamente relacionado ao tamanho dos órgãos internos responsáveis pelo armazenamento de espermatozoides (Charnov 1996). Desse modo, em um cenário onde os custos de inseminação não são triviais e a fecundidade é diretamente proporcional ao tamanho, é esperado que animais copulem preferencialmente com indivíduos de mesmo tamanho ou maiores, pois indivíduos menores produziriam menos ovos (Anthes et al. 2010). Evidências corroborando a existência de preferência do maior parceiro pelo papel feminino em cópulas unilaterais (i.e., onde um indivíduo atua apenas como “macho” e o outro apenas como “fêmea”) já foram demonstradas em gastrópodes marinhos, terrestres e de água doce (e.g., DeWitt 1996; Tomiyama 1996; Sprenger et al. 2009). Por outro lado, em espécies que realizam troca recíproca de esperma, a preferência por inseminar indivíduos maiores resultaria em cópula entre parceiros de tamanhos similares (Anthes et al. 2010). Até então, entretanto, há poucas evidências que corroborem essa previsão (Michiels et al. 2001; Monroy et al. 2005;

Pal et al. 2006). Por fim, o tamanho corporal do parceiro poderia influenciar o investimento “masculino” dos indivíduos durante a cópula, onde mais espermatozoides seriam doados para parceiros mais fecundos (Wedell et al. 2002). Evidências nesse sentido já foram reportadas para algumas espécies (e.g., Angeloni 2003; Michiels et al. 2003).

Muitas espécies de hermafroditas são promíscuas e possuem órgãos capazes de estocar aloesperma (i.e., espermatozoides exógenos), havendo condições para que haja competição espermática (Baur 1988). Desse modo, o histórico de cópula de um parceiro pode ser um proeminente critério de escolha, principalmente sob a perspectiva “masculina” (Anthes 2010). Em um estudo feito com uma espécie de lesma marinha que deposita espermatóforos na parede do corpo do parceiro, foi observado que indivíduos que carregavam espermatóforos eram mais frequentemente rejeitados durante interações pré-copulatórias quando comparados a indivíduos que tiveram o espermatóforo experimentalmente removido (Haase & Karlsson 2004). Mesmo em hermafroditas que não depositam espermatóforos externamente, i.e., sem sinais externos do seu histórico de cópula, já foi evidenciada influência deste fator na escolha de parceiros e comportamento de cópula (Michiels & Bakovski 2000; Anthes et al. 2006). Tais achados sugerem a existência de outros sinais que permitem o acesso ao histórico de cópula de um parceiro (Anthes 2010).

O endocruzamento geralmente ocasiona efeitos deletérios à prole, uma vez que aumenta a quantidade de homozigose, aumentando assim a expressão de doenças recessivas e/ou reduzindo a diversidade genética. Portanto, seria vantajoso se a escolha dos parceiros levasse em conta a qualidade genética dos mesmos (Anthes 2010). Estudos com caramujos de água doce do gênero *Physa* evidenciaram que estes organismos são capazes de discriminar indivíduos mais aparentados no momento da cópula, e que isso pode resultar em diferentes comportamentos de acasalamento. Tais estudos indicaram uma preferência por parceiros com graus intermediários de parentesco (McCarthy 2004; Facon et al. 2006; McCarthy & Sih 2008), o que proporcionaria a manutenção da diversidade genética sem perda de genótipos benéficos (Anthes 2010). Por outro lado, existem espécies que não parecem evitar o endocruzamento, e diferentes hipóteses foram propostas para explicar esse comportamento (e.g., Baur & Baur 1997; Schjørring & Jäger 2007). Por exemplo, estratégias reprodutivas que envolvam uma dispersão eficiente de indivíduos podem

tornar o encontro entre irmãos tão improvável que uma escolha criteriosa de parceiros nesse sentido seria irrelevante (e.g., Peters & Michiels 1996). De qualquer modo, os mecanismos envolvidos no reconhecimento do grau de parentesco ainda são pouco compreendidos (Anthes 2010).

Mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual em hermafroditas simultâneos

Apesar das evidências já discutidas de ocorrência de escolha criteriosa de parceiros em hermafroditas simultâneos, a importância dos mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual nestes organismos é muito mais claramente estabelecida (Schärer & Ramm 2016). De fato, vários autores especularam que a seleção sexual nestes hermafroditas seria mais proeminente na arena pós-acasalamento, quando comparados aos animais dioicos (Janicke et al. 2016). Isto ocorreria devido a uma maior propensão à cópula, decorrente do interesse comum de ambos os parceiros em doar esperma, principalmente nos hermafroditas simultâneos, nos quais o acasalamento é geralmente recíproco. Consequentemente, haveria maior intensidade de competição espermática e maior potencial de ECF (Michiels 1998; Schärer & Pen 2013).

Como já mencionado, a promiscuidade e a presença de órgãos de armazenamento de aloesperma geram um cenário potencial para a competição espermática (Baur 1998). Muitas das adaptações pós-copulatórias sexualmente selecionadas, que são comumente conhecidas em animais dioicos, têm sido documentadas em espécies hermafroditas (Schärer & Ramm 2016). Uma resposta clássica à competição espermática é a transferência de maior quantidade de espermatozoides durante a cópula (Parker 1998). Modelos teóricos, assumindo que a produção de espermatozoides é custosa e que os espermatozoides competem numericamente, preveem que, quando a competição espermática é intensa, os machos deveriam investir mais na produção de espermatozoides para conseguir uma maior taxa de paternidade (Parker 1998). Vários estudos comparativos suportam essa predição, evidenciando que machos de espécies sujeitas à maior intensidade de competição espermática apresentam testículos relativamente maiores (e.g., Hosken 1997; Stockley et al. 1997; Byrne et al. 2002; Pitcher et al. 2005). Há evidências similares para hermafroditas simultâneos, não só em relação ao tamanho da gônada masculina, mas também à taxa de produção de espermatozoides (e.g., Schärer &

Ladurner 2003; Schärer et al. 2004; Schärer & Vizoso 2007; Ramm & Stockley 2009). Além disso, várias outras adaptações associadas à processos pós-copulatórios são conhecidas nestes hermafroditas. Um exemplo clássico é a cópula traumática, que pode ser colateral ou adaptativa (Lange et al. 2013). Cópula traumática colateral pode ser exemplificada pela a inoculação de substâncias bioativas que causam modificações nos processos reprodutivos do parceiro. Por exemplo, algumas espécies de caramujos terrestres fincam “dardos-do-amor” no parceiro durante a corte. Aqueles mais eficientes na fixação desses dardos apresentam maiores taxas de paternidade, devido a modificações no funcionamento do sistema reprodutor do parceiro induzidas pelo muco injetado com o dardo (Landolfa et al. 2001). Algumas espécies de minhocas apresentam uma estratégia similar (e.g., setas copulatórias; Koene et al. 2002). Um exemplo de cópula traumática adaptativa seria o pênis em forma de estilete de algumas espécies de lesmas marinhas (e.g., Lange et al. 2013; Schärer & Ramm 2016), que causam feridas no parceiro durante a cópula. Uma hipótese para explicar esse fenômeno é a de que, ao ferir o parceiro, os recursos energéticos do mesmo seriam preferencialmente alocados na sua recuperação, fazendo com que ele evitasse cópulas consecutivas e, conseqüentemente, elevasse o sucesso de fertilização em curto prazo do doador de espermatozoides (Michiels 1998).

Além de órgãos de armazenamento de aloesperma, representantes da maioria dos principais táxons de hermafroditas simultâneos com fertilização interna também possuem órgãos ou células capazes de digerir espermatozoides (Baur 1998; Michiels 1998). O comportamento reprodutivo promíscuo, juntamente com a presença desses órgãos, representam condições potenciais para que haja ECF. Os receptores de espermatozoides poderiam, por exemplo, utilizar a capacidade de digestão de aloesperma como uma forma de reduzir o sucesso de fertilização de parceiros de baixa qualidade (Birkhead et al. 1993). Alternativamente, espermatozoides excedentes poderiam ser digeridos para fins energéticos, servindo como uma fonte de nutrientes (Brandriff & Beeman 1973; Calow et al. 1979). Reabsorção de espermatozoides exógenos é conhecida, por exemplo, em alguns platelmintos (e.g., Sluys 1989) e minhocas (e.g., Grove 1925). Digestão de espermatozoides também já foi observada em lesmas marinhas (e.g., Brandriff & Beeman 1973). Entretanto, estudos sobre ECF em hermafroditas estão geralmente limitados a modelos teóricos.

Por exemplo, há vários estudos sobre as implicações de ECF em termos de alocação sexual (i.e., quantidade de recursos reprodutivos empregada nas funções feminina e masculina por um indivíduo) em hermafroditas simultâneos (e.g., Greeff & Michiels 1999b; Greeff & Parker 2000; Schärer 2009; Velzen et al. 2009).

Seleção Sexual em lesmas marinhas

Lesmas marinhas, moluscos gastrópodes pertencentes ao táxon Heterobranchia, são em sua grande maioria hermafroditas simultâneos durante a maior parte de seu ciclo reprodutivo e possuem sistemas reprodutores complexos (Hadfield & SwitzerDunlap 1984). A fertilização é interna e cruzada, embora existam algumas poucas exceções (Baur 1998). Nesses organismos, as estruturas consideradas responsáveis pelo recebimento e armazenamento de aloesperma são a bursa copulatória e o receptáculo seminal, respectivamente (Gosliner 1994). Segundo Beeman (1970), a bursa copulatória seria uma das estruturas mais enigmáticas do sistema reprodutor de lesmas marinhas, pois já foi relacionada a diferentes funções. Há, inclusive, evidência de digestão de espermatozoides por esse órgão em algumas espécies (e.g. Schmekel, 1971; Brandriff & Beeman 1973).

Uma vez que lesmas marinhas geralmente possuem órgãos armazenadores de espermatozoides que poderiam participar de processos pós-copulatórios de seleção sexual, a atividade destes órgãos poderia influenciar resultados de experimentos, por exemplo, afetando taxas de paternidade resultantes de cópulas com parceiros qualitativamente diferentes. Desse modo, o funcionamento desses órgãos compõe uma importante fonte de informação para a elaboração de modelos teóricos sobre seleção sexual em hermafroditas simultâneos. De acordo com Eberhard (2009), o uso de caracteres genitais no âmbito taxonômico gerou uma imensa literatura sobre a morfologia dos órgãos reprodutores nos mais diferentes grupos animais, dados estes que poderiam ser empregados para ilustrar argumentos relacionados à seleção sexual pós-copulatória. Nesse contexto, estudos morfofuncionais sobre o trato reprodutivo de hermafroditas simultâneos associados a situações experimentais constituem uma abordagem promissora para inferências sobre processos de seleção sexual.

O nudibrânquio *Okenia polycerelloides* (Ortea & Bouchet 1983) é abundante no litoral de São Paulo, além de se tratar de um organismo de fácil coleta, cultivo e manutenção em laboratório. É uma espécie hermafrodita simultânea, promíscua, com

fertilização interna cruzada, possui atividade reprodutiva ao longo de todo o ano, variação no tamanho de indivíduos sexualmente maduros e sistema reprodutor complexo, possuindo tanto a bursa copulatória quanto o receptáculo seminal. Todas essas características fazem dessa espécie um potencial organismo modelo para estudos de seleção sexual em hermafroditas simultâneos.

Objetivos

Esta tese teve como objetivo geral investigar a estrutura e a função dos órgãos que abrigam espermatozoides no sistema reprodutor do nudibrânquio *O. polycerelloides*, como base para identificação de possíveis processos pós-copulatórios de seleção sexual em lesmas marinhas. Especificamente, esta tese pretendeu responder as seguintes perguntas: Quais as funções do receptáculo seminal e da bursa copulatória? Tais órgãos estão relacionados à digestão de esperma? O que ocorre com o aloesperma após a cópula? Em havendo digestão de esperma, tal comportamento está relacionado a situações de limitação de recursos alimentares? Ademais, foi estudado o comportamento de cópula dessa e de outra espécie de nudibrânquio, *Phidiana lynceus* Bergh, 1867. Todos os resultados são discutidos à luz da teoria de seleção sexual em hermafroditas simultâneos.

Organização da tese

Além desta “Introdução Geral” e das “Considerações Finais”, esta tese está estruturada em três capítulos escritos em formato de artigo científico e redigidos em inglês. Respektivas figuras e referências são apresentadas ao final de cada capítulo.

O capítulo 1, intitulado “Functional morphology of the sperm-containing chambers of the reproductive system of *Okenia polycerelloides* (Ortea & Bouchet 1983)” apresenta uma descrição detalhada da ampola, receptáculo seminal e bursa copulatória da espécie em questão com base em dados de microscopia óptica, confocal e eletrônica de transmissão. Detalhes da organização geral do sistema reprodutor da espécie também são apresentados. Baseado nos resultados obtidos, possíveis funções são inferidas para esses órgãos. Esse capítulo, portanto, visa responder as questões: Quais as funções do receptáculo seminal e da bursa

copulatória? Tais órgãos estão relacionados à digestão de esperma?

O capítulo 2, intitulado “Sperm transfer, storage and digestion in a sea slug: towards understanding post-copulatory sexual selection mechanisms in simultaneous hermaphrodites” reúne dados de estudo histológico do sistema reprodutor de *O. polycerelloides* associado a manipulações de cópula e a um experimento onde os indivíduos foram submetidos à privação alimentar. Dessa forma, os resultados apresentados nesse capítulo visam responder as seguintes perguntas: O que ocorre com o aloesperma após a cópula? Em havendo digestão de esperma, tal comportamento está relacionado a situações de limitação de recursos alimentares? Ademais, o comportamento de cópula da espécie é descrito.

O capítulo 3, intitulado “Love will tear us apart: traumatic mating through consumption of body parts in a sea slug” documenta o interessante comportamento de cópula do nudibrânquio *Phidiana lynceus*, o qual consome cerata durante o acasalamento. Essa descoberta é discutida com base nas hipóteses propostas para explicar a evolução da cópula traumática. Esse manuscrito foi submetido ao periódico internacional *Ecology* e encontra-se em fase de revisão.

Referências

- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton, Princeton University Press.
- Angeloni, L. 2003. Sexual selection in a simultaneous hermaphrodite with hypodermic insemination: body size, allocation to sexual roles and paternity. *Anim. Behav.* 66:417–426.
- Angeloni, L. & Bradbury, J. 1999. Body size influences mating strategies in a simultaneously hermaphroditic sea slug, *Aplysia vaccaria*. *Ethol Ecol Evol* 11:187–195.
- Angeloni, L.; J.W. Bradbury & R.S. Burton. 2003. Multiple mating, paternity, and body size in a simultaneous hermaphrodite, *Aplysia californica*. *Behavioral Ecology* 14:554–560.
- Anthes, N.; Putz, A.; Michiels, N.K. 2006. Hermaphrodite sex role preferences: the role of partner body size, mating history and female fitness in the sea slug *Chelidonura sandrana*. *Behav Ecol Sociobiol* 60:359–367.

- Anthes, N. 2010. Mate choice and reproductive conflict in simultaneous hermaphrodites. In: P. Kappeler (ed.) *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*. Springer, Berlin. pp. 329–357.
- Avisé, J.C. 2011. *Hermaphroditism: A Primer on the Biology, Ecology, and Evolution of Dual Sexuality*. Columbia University Press.
- Baur B. & Baur A. 1997. Random mating with respect to relatedness in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. *Invert. Biol.* 116:294–298.
- Baur, B. 1998. Sperm competition in molluscs. In: T.R. Birkhead & A.P. Møller (eds.) *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, London. pp. 255–305.
- Beeman, R. 1970. An autoradiographic study of sperm exchange and storage in a sea hare, *Phyllaplysia taylori*, a hermaphroditic gastropod (Opisthobranchia: Anaspidea). *Journal of Experimental Zoology* 175:125–132.
- Birkhead, T.R.; Moller, A.P. & Sutherland, W.J. 1993. Why do females make it so difficult for males to fertilize their eggs? *Journal of Theoretical Biology* 161:51–60.
- Brandriff, B. & Beeman, R. 1973. Observations on the gametolytic gland in the anaspidean opisthobranchs, *Phyllaplysia taylori* and *Aplysia californica*. *Journal of Morphology* 141:395–409.
- Byrne, P.G.; Roberts, J.D. & Simmons, L.W. 2002. Sperm competition selects for increased testes mass in Australian frogs. *J. Evol. Biol.* 15:347–355.
- Calow, P.; Beveridge, M. & Sibly, R. 1979. Heads and tails: adaptational aspects of asexual reproduction in freshwater triclads. *American Zoologist* 19:715–727.
- Charnov, E.L. 1979. Simultaneous hermaphroditism and sexual selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(5): 2480–2484.
- Charnov, E.L. 1996. Sperm competition and sex allocation in simultaneous hermaphrodites. *Evolutionary Ecology* 10:457–462.
- Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London, John Murray.
- Darwin, C. 1871. *The descent of man and selection in relation to sex*. London, John Murray.

- Darwin, C. 1874. The descent of man and selection in relation to sex. London, John Murray.
- DeWitt, T.J. 1996. Gender contests in a simultaneous hermaphrodite snail: a size-advantage model for behaviour. *Anim. Behav.* 51:345–351
- Eberhard, W.G. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton. Princeton University Press.
- Eberhard, W.G. 2009. Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *PNAS* 106(1):10025–10032.
- Facon, B.; Ravigné, V. & Goudet, J. 2006. Experimental evidence of inbreeding avoidance in the hermaphroditic snail *Physa acuta*. *Evol Ecol* 20:395–406.
- Gosliner, T.M. 1994. Gastropoda: Opisthobranchia. In: F. Harrison & A. Kohn (eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 5. New York, John Wiley and Sons. pp. 253–355.
- Greeff, J.M. & Parker, G.A. 2000. Spermicide by females: what should males do? *Proc. R. Soc. Lond.* 267:1759–1763.
- Greeff, J. M. & N. K. Michiels. 1999a. Low potential for sexual selection in simultaneously hermaphroditic animals. *Proc. R. Soc.* 266:1671–1676.
- Greeff, J.M. & Michiels, N.K. 1999b. Sperm digestion and reciprocal sperm transfer can drive hermaphrodite sex allocation to equality. *American Naturalist* 153:421–430.
- Grove, A.J. 1925. On the reproductive processes of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 69: 245–291.
- Haase, M. & Karlsson, A. 2004. Mate choice in a hermaphrodite: you won't score with a spermatophore. *Anim Behav* 67:287–291.
- Hadfield, M. & Switzer-Dunlap, M. 1984. Opisthobranchs. In: A. Tompa & N. Verdonk (eds.) *The Mollusca*. Vol. 7. Academic Press, New York. pp. 209–350.
- Hosken, D.J. 1997. Sperm competition in bats. *Proc. R. Soc.* 264:385–392.
- Janicke T.; Sandner, P.; Ramm, S.A.; Vizoso, D.B. & Scharer, L. 2016. Experimentally evolved and phenotypically plastic responses to enforced monogamy in a hermaphroditic flatworm. *J. Evol. Biol.* 29:1713–1727.

- Koene, J.M.; Sundermann, G. & Michiels, N.K. 2002. On the function of body piercing during copulation in earthworms. *Invertebrate Reproduction and Development* 41:35–40.
- Koene, J.M. 2006. Tales of two snails: sexual selection and sexual conflict in *Lymnaea stagnalis* and *Helix aspersa*. *Integrative and Comparative Biology* 46(4):419–429.
- Kuwamura, T.; Nakashima, Y. & Yogo, Y. 1994. Sex change in either direction by growth-rate advantage in the monogamous coral goby, *Paragobiodon echinocephalus*. *Behav. Ecol.* 5:434–438.
- Landolfa, M.A.; Green, D.M. & Chasea, R. Dart shooting influences paternal reproductive success in the snail *Helix aspersa* (Pulmonata, Stylommatophora). *Behavioral Ecology* 12(6):773–777.
- Lange, R.; Reinhardt, K.; Michiels, N.K. & Anthes, N. 2013. Functions, diversity, and evolution of traumatic mating. *Biological Reviews* 88:585–601.
- Leonard, J.L. 2013. Sexual selection and hermaphroditic organisms: Testing theory. *Current Zoology* 59 (4):579–588.
- McCarthy, T.M. 2004. Effects of pair-type and isolation time on mating interactions of a freshwater snail, *Physa gyrina* (Say, 1821). *Am. Malacol. Bull.* 19:47–55.
- McCarthy, T.M. & Sih, A. 2008 Relatedness of mates influences mating behavior and reproductive success of the hermaphroditic freshwater snail *Physa gyrina*. *Evol. Ecol. Res.* 10:77–94.
- Michiels, N.K. 1998. Mating conflicts and sperm competition in simultaneous hermaphrodites. In: T. Birkhead & A.P. Møller (eds.) *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, London. pp. 219–254.
- Michiels, N.K. & Bakovski, B. 2000. Sperm trading in a hermaphroditic flatworm: reluctant fathers and sexy mothers. *Anim. Behav.* 59: 319–325.
- Michiels, N.K.; Hohner, A. & Vorndran, I.C. 2001. Precopulatory mate assessment in relation to body size in the earthworm *Lumbricus terrestris*: avoidance of dangerous liaisons? *Behavioral Ecology* 12:612–618.
- Michiels, N.K.; Raven-Yoo-Heufes, A. & Kleine Brockmann, K. 2003. Sperm trading and sex roles in the hermaphroditic opisthobranch sea slug *Navanax inermis*: eager females or opportunistic males? *Biol. J. Linn. Soc.* 78:105–116.

- Monroy, F.; Aira, M.; Velando, A & Domínguez, J. 2005. Size-assortative mating in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *J. Ethol.* 23:69–70.
- Morgan, M.T. 1994. Models of sexual selection in hermaphrodites, especially plants. *Am. Nat.* 144: S100–S125.
- Nakashima, Y.; Kuwamura, T. & Yogo, Y. 1995. Why be a both-ways sex changer. *Ethology* 101:301–307.
- Pal, P.; Erlandsson, J. & Sköld, M. 2006. Size-assortative mating and non-reciprocal copulation in a hermaphroditic intertidal limpet: test of the mate availability hypothesis. *Mar Biol* 148:1273–1282.
- Parker, G.A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews* 45:525–567.
- Parker, G.A. 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. In: T. Birkhead & A.P. Møller (eds.) *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, London. pp. 3–54.
- Peters, A. & Michiels, N.K. 1996. Evidence for lack of inbreeding avoidance by selective mating in a simultaneous hermaphrodite. *Invert. Biol.* 115:99–103.
- Pitcher, T.E.; Dunn, P.O. & Whittingham, L.A. 2005. Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *J. Evol. Biol.* 18:557–567.
- Ramm, S.A. & Stockley, P. 2009. Adaptive plasticity of mammalian sperm production in response to social experience. *Proc. R. Soc.* 276:745–751.
- Schärer, L. & Ladurner, P. 2003. Phenotypically plastic adjustment of sex allocation in a simultaneous hermaphrodite. *Proc. R. Soc.* 270:935–941.
- Schärer, L. & I. Pen. 2013. Sex allocation and investment into pre- and post-copulatory traits in simultaneous hermaphrodites: the role of polyandry and local sperm competition. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 368:20120052.
- Scharer, L. & Ramm, S.A. 2016. Hermaphrodites. *Encyclopedia of Evolutionary Biology* 2:212–224.
- Schärer, L. & Vizoso, D.B. 2007. Phenotypic plasticity in sperm production rate: there's more to it than testis size. *Evol. Ecol.* 21:295–306.
- Schärer, L.; Ladurner, P. & Rieger, R.M. 2004. Bigger testes do work more: experimental evidence that testis size reflects testicular cell proliferation activity in the marine invertebrate, the free-living flatworm *Macrostomum* sp. *Behav Ecol Sociobiol* 56:420–425.

- Schärer, L.; Janicke, T. & Ramm, S.A. 2015. Sexual Conflict in Hermaphrodites. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7:25.
- Schärer, L. 2009. Tests of sex allocation theory in simultaneously hermaphroditic animals. *Evolution* 63:1377–1405.
- Schjørring, S. & Jäger, I. 2007. Incestuous mate preference by a simultaneous hermaphrodite with strong inbreeding depression. *Evolution* 61:423–430.
- Schmekel, L. 1971. Histologie und Feinstruktur der Genitalorgane von Nudibranchiern (Gastropoda, Euthyneura). *Z. Morphol. Tiere* 69:115–183.
- Sluys, R. 1989. Sperm resorption in triclads (Platyhelminthes, Tricladida). *Invert. Reprod. Devel.* 15(2):89–95.
- Sprenger, D.; Lange, R.; Michiels, N.K. & Anthes, N. 2009. The role of body size in early mating behavior in a simultaneous hermaphrodite, *Chelidonura sandrana*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63:953–958.
- Stockley, P.; Gage, M.J.G.; Parker, G.A. & Møller, A.P. 1997. Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *Am. Nat.* 149:933–954.
- Tomiyama, K. 1996. Mate-choice criteria in a protandrous simultaneously hermaphroditic land snail *Achatina fulica* (Férussac) (Stylommatophora:Achatinidae). *J. Moll. Stud.* 62:101–111.
- Velzen, E.; Schärer, L. & Pen, I. 2009. The effect of cryptic female choice on sex allocation in simultaneous hermaphrodites. *Proc. R. Soc.* 276: 3123–3131.
- Wedell, N.; Gage, M.J.G. & Parker, G.A. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends. Ecol. Evol.* 17:313–320.

Considerações Finais

Embora estudos morfofuncionais sobre órgãos que contêm espermatozoides (i.e., ampola, bursa copulatória e receptáculo seminal) no sistema reprodutor de lesmas marinhas já tenham sido realizados com algumas espécies (e.g., Beeman 1970a; Schmekel 1971; Brandriff & Beeman 1973; Medina et al. 1988), há ainda muita controvérsia acerca das possíveis funções de tais órgãos (Medina et al. 1988). Por exemplo, no que diz respeito aos nudibrânquios doridídeos, a bursa copulatória já havia sido relacionada tanto à recepção quanto à digestão de esperma (e.g., Thompson 1966). Porém, se tais funções são desempenhadas pelo mesmo órgão, seria necessário um preciso controle sobre o processo de digestão, caso contrário, o esperma poderia sofrer danos antes de ser direcionado para o receptáculo seminal para armazenamento.

Devido a certas características (e.g., comportamento de cópula promíscuo, sistema reprodutor complexo, fácil coleta e manutenção em laboratório), o nudibrânquio doridídeo *Okenia polycerelloides* mostrou-se um excelente organismo modelo para estudos de seleção sexual em hermafroditas. Considerando a inexistência de dados morfofuncionais sobre seu sistema reprodutor e a importância de órgãos de armazenamento e digestão de espermatozoides em um contexto de seleção sexual, foi necessário um estudo morfológico detalhado dos órgãos que abrigam espermatozoides no sistema reprodutor dessa espécie. Tais dados, apresentados no capítulo 1 da presente Tese, revelaram que pode haver separação espacial das massas de espermatozoides no receptáculo seminal, suscitando questões sobre estratificação de espermatozoides associada a cópulas múltiplas. De modo similar, a constatação da função de digestão pela bursa copulatória levantou dúvidas sobre a função de recepção de espermatozoides hipotetizada para nudibrânquios doridídeos (e.g. Hadfield & Switzer-Dunlap 1984; Gosliner 1994; Valdes et al. 2010). Tais questões foram então investigadas e elucidadas no trabalho apresentado no capítulo 2 desta Tese.

No capítulo 2, revelou-se que o órgão responsável pela recepção de espermatozoides em *O. polycerelloides* é o receptáculo seminal, e que a função primordial da bursa copulatória é a digestão. Considerando a hipótese de que produtos resultantes da digestão de gametas poderiam ser absorvidos pela bursa

copulatória e utilizados como recurso energético em situações de restrição alimentar (Brandriff & Beeman 1973), testamos se tal situação influenciaria a ocorrência de digestão de espermatozoides. Entretanto, os resultados indicaram que a bursa copulatória está continuamente digerindo espermatozoides. Os padrões observados nas manipulações de cópula demonstraram ainda que pelo menos parte dos espermatozoides recebidos é transferida para a bursa copulatória, corroborando a hipótese de digestão de espermatozoides supérfluos por esse órgão. Porém, apesar desses resultados indicarem digestão indiscriminada de espermatozoides, houve um caso de digestão completa do aloesperma, o que sugere escolha críptica da “fêmea”. Ademais, a redução progressiva no conteúdo da bursa copulatória com o aumento do tempo pós-cópula sugere absorção dos gametas digeridos. Características do epitélio da bursa copulatória descritas no capítulo 1 também sugerem tal função. Possíveis valores fisiológicos associados à reabsorção de gametas digeridos merecem futuras investigações.

Ainda no capítulo 2, foi constatado estratificação de espermatozoides apenas em situações com mais de uma cópula. Além disso, a orientação radial dos espermatozoides no receptáculo de *O. polycerelloides* pode ocorrer em diferentes tempos pós-cópula, inclusive em tempos tão curtos quanto 30 min, diferentemente do reportado para *Phyllaplysia taylori* (Beeman 1970b), que requer um tempo mínimo de 5 h. Especula-se que as diferentes orientações dos espermatozoides no receptáculo seminal de *O. polycerelloides* poderiam estar associadas a diferentes tempos de resposta a um possível sinal químico produzido pelo receptáculo seminal.

O comportamento de cópula de *O. polycerelloides* inclui contato oral, alinhamento, intromissão do pênis e transferência de espermatozoides. Tais interações podem ser interrompidas em qualquer um desses estágios, e mesmo a intromissão do pênis não resulta necessariamente em inseminação. Levando em conta que *O. polycerelloides* apresenta fertilização interna, especula-se que a intromissão do pênis poderia ser inicialmente utilizada como uma forma de acessar o histórico de cópula, sendo uma possível estratégia de escolha do parceiro. De maneira similar, o contato oral entre parceiros poderia ser uma forma de averiguar o tamanho corporal dos mesmos, podendo ser também uma estratégia associada à escolha de parceiro.

O comportamento de cópula da espécie *Phidiana lynceus*, apresentado no capítulo 3 desta Tese, possui como característica marcante o consumo de partes

corpóreas extragenitais do parceiro durante o acasalamento. Trata-se de uma cópula traumática do tipo “penetração traumática extragenital” (Lange et al. 2013). Além de sua importância para o conhecimento do comportamento de cópula de lesmas marinhas, a descoberta desse fenômeno revelou um organismo-modelo que possivelmente permitirá testar a hipótese de trauma adaptativo, que é uma das hipóteses propostas para explicar a evolução da cópula traumática. Ademais, essa espécie apresenta o pênis com aspecto glandular e que porta um estilete que serve como canal para transferência de espermatozoides. Em um dos eventos de cópula analisados, foi observado um parceiro projetando a ponta do seu pênis no dorso do outro indivíduo por alguns segundos. Existe a possibilidade, portanto, da injeção de substâncias na parede do corpo do parceiro, o que precisa ser investigado futuramente.

Por fim, ao descrever o funcionamento dos órgãos de armazenamento e digestão de espermatozoides de *O. polycerelloides*, bem como o comportamento de cópula de *O. polycerelloides* e de *Phidiana lynceus*, este trabalho suscitou questões importantes sobre seleção sexual pré- e pós-copulatória em hermafroditas simultâneos. Certamente, quando publicados, esses resultados estimularão futuras investigações sobre o tema utilizando lesmas marinhas como organismos modelo.

Referências

- Beeman, R. 1970a. The anatomy and functional morphology of the reproductive system in the opisthobranch mollusk *Phyllaplysia taylori* Dall, 1900. *The Veliger* 13:1–31.
- Beeman, R. 1970b. An autoradiographic study of sperm exchange and storage in a sea hare, *Phyllaplysia taylori*, a hermaphroditic gastropod (Opisthobranchia: Anaspidea). *Journal of Experimental Zoology* 175:125–132.
- Brandriff, B. & Beeman, R. 1973. Observations on the gametolytic gland in the anaspidean opisthobranchs, *Phyllaplysia taylori* and *Aplysia californica*. *Journal of Morphology* 141:395–409.
- Gosliner, T.M. 1994. Gastropoda: Opisthobranchia. In: F. Harrison & A. Kohn (eds.) *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 5. New York, John Wiley and Sons. pp. 253–355.

- Hadfield, M. & Switzer-Dunlap, M. 1984. Opisthobranchs. In: A. Tompa & N. Verdonk (eds.) *The Mollusca*. Vol. 7. Academic Press, New York. pp. 209–350.
- Lange, R.; Reinhardt, K; Michiels, N.K. & Anthes, N. 2013. Functions, diversity, and evolution of traumatic mating. *Biological Reviews* 88:585–601.
- Medina, A.; Griffond, B.; Garcia-Gomez, J.C. & Garcia, F.J. 1988. Ultrastructure of the gametolytic gland and seminal receptacle in *Hypselodoris messinensis* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Journal of Morphology* 195:95–102.
- Schmekel, L. 1971. Histologie und Feinstruktur der Genitalorgane von Nudibranchiern (Gastropoda, Euthyneura). *Z. Morphol. Tiere* 69:115–183.
- Thompson, T.E. 1966. Studies on the reproduction of *Archidoris pseudoargus* (Rapp) (Gastropoda, Opisthobranchia). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]* 250:343–375.
- Valdés, A.; Gosliner, T.M. & Ghiselin, M.T. 2010. Opisthobranchs. In: J. Leonard & A. Cordoba-Aguilar (eds.) *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals*. Oxford University Press, New York. pp. 148–172.

Resumo

A seleção sexual atua significativamente na diversificação de atributos reprodutivos. Muitos hermafroditas possuem órgãos para armazenamento e digestão de espermatozoides, os quais estão potencialmente envolvidos em mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual, como competição espermática e escolha críptica da “fêmea”. Tais processos geralmente ocorrem no interior do sistema reprodutor feminino, portanto, o conhecimento sobre sua morfologia funcional é de extrema importância para compreensão de mecanismos pós-copulatórios. Lesmas marinhas são predominantemente hermafroditas e possuem sistema reprodutor complexo, incluindo órgãos para armazenamento e digestão de esperma. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o comportamento de cópula e a morfologia funcional dos órgãos que contêm esperma no sistema reprodutor feminino do nudibrânquio *Okenia polycerelloides* (Ortea & Bouchet 1983), bem como o comportamento de cópula do nudibrânquio *Phydiana lynceus* Bergh 1867. Para o estudo morfológico, foram empregadas técnicas de microscopia óptica, confocal e eletrônica. Manipulações experimentais e análises histológicas foram combinadas para investigar o destino dos espermatozoides dentro do sistema reprodutor após uma e duas cópulas subsequentes, e se a ausência de alimento influencia a ocorrência de digestão de espermatozoides. Os resultados sugerem função de recepção e armazenamento de espermatozoides para o receptáculo seminal, e de digestão de espermatozoides para a bursa copulatória. Cópulas múltiplas podem levar à estratificação de espermatozoides no receptáculo seminal. Embora a ausência de alimento aparente intensificar a digestão de esperma, ela não determinou sua ocorrência. A digestão de espermatozoides ocorreu continuamente, e pelo menos parte dos espermatozoides recebidos em cada cópula foi direcionada para a bursa copulatória, corroborando a hipótese prévia de digestão de espermatozoides supérfluos. Entretanto, todo o aloesperma recebido pode também ser digerido, sugerindo a possibilidade de escolha críptica. Redução gradual dos conteúdos da bursa copulatória associada ao aumento do tempo pós-cópula sugere reabsorção do material digerido. Interações de cópula em *O. polycerelloides* incluem contato mútuo utilizando a região oral, alinhamento corporal, intromissão do pênis e transferência de esperma. Porém, as interações podem ser interrompidas em qualquer um desses estágios, e mesmo intromissão do pênis não implica em inseminação. *P. lynceus* exibe cópula traumática, na qual parceiros consomem cerata um do outro durante a cópula, um fenômeno inédito dentre as complexas estratégias reprodutivas de hermafroditas.

Abstract

Sexual selection is pervasive and shapes reproductive traits. Many hermaphrodites have organs for sperm storage and digestion, which are potentially involved in post-copulatory sexual selection mechanisms such as sperm competition and cryptic "female" choice. In animals with internal fertilization, these processes occur within the female reproductive tract, thus the knowledge of its functional morphology is of utmost importance for understanding post-copulatory mechanisms of sexual selection. Most sea slugs are hermaphrodites and have a complex reproductive system, with organs for sperm storage and digestion. In this context, the present study aimed to investigate the mating behavior and the functional morphology of the sperm-containing chambers of the reproductive tract of the nudibranch *Okenia polycerelloides* (Ortea & Bouchet 1983), and the mating behavior of the nudibranch *Phidiana lynceus* Bergh 1867. First, we have applied different microscopy techniques (light, confocal and transmission electron microscopy) to study the sperm-containing chambers of *O. polycerelloides*. Then, we have combined experimental manipulations and histological analyses to investigate the fate of sperm within the female reproductive tract after one and two subsequent matings, and if starvation influences the occurrence of sperm digestion. Sperm was received and stored by the seminal receptacle, while the bursa copulatrix had a digestive function. Multiple mating events could lead to sperm stratification in the seminal receptacle. Although starvation seemed to intensify sperm digestion in the bursa copulatrix, it did not determine its occurrence. Sperm digestion occurred continuously, and at least some amount of sperm received during each mating event was directed to the bursa copulatrix to be digested, corroborating a previous hypothesis of surplus sperm digestion. However, all received sperm could also be directed to the bursa copulatrix, suggesting the possibility of cryptic female choice. Gradual reduction of the contents of the bursa copulatrix with increasing post-copulation times suggests resorption of the digested gametes. Mating interactions in *O. polycerelloides* initiated by mutual contact using the oral region, followed by body alignment, penis intromission, and sperm transfer. However, interactions could end at any of these stages, and even penis intromission did not guarantee insemination. *Phidiana lynceus* exhibited traumatic mating, in which partners consume cerata from one another before sperm exchange, clearly adding to the complexity of mating strategies in hermaphrodites.