

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM TARDÍGRADOS (FILO TARDIGRADA): SUGESTÃO DE PROTOCOLOS ADAPTADOS ÀS PECULIARIDADES DO GRUPO

Edivaldo L. Gomes Jr¹; Clélia M. C. da Rocha²

¹Universidade Federal de Pernambuco; Centro de Ciências Biológicas (CCB); Departamento de Zoologia/Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. Av. Prof. Moraes Rêgo S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. Email: edivaldoljr@hotmail.com

²Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Biologia (DB) - Av. Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos - 52171-900, Recife, Pernambuco - Brasil. Email: cavalcanticlelia@yahoo.com.br

RESUMO

Os protocolos existentes para processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) frequentemente não produzem bons resultados quando aplicados a tardígrados. Este estudo objetivou adaptar protocolos padrão para invertebrados, no intuito de serem obtidos melhores resultados com amostras desse grupo. As duas adaptações sugeridas descrevem as etapas de preparação do material, tais como fixação, forma de acondicionamento dos espécimes, lavagens, pós-fixação, desidratação, secagem ao ponto crítico, metalização e o modo de utilização do MEV. Na sugestão de protocolo "A", o material é fixado em formol 4%, as lavagens são procedidas em tampão cacodilato de sódio e água destilada, a pós- fixação com tetróxido de ósmio, desidratação com imersão em acetona, a secagem da amostra ao ponto crítico com CO₂, metalização em ouro e o microscópio configurado no modo alto vácuo. Na sugestão de protocolo "B" o material é fixado em etanol 70%, os exemplares acondicionados em cápsulas com malhas nas extremidades, com etapas de lavagem e pós-fixação suprimidas do processo. A desidratação é feita em etanol e acetona, secagem ao ponto crítico com CO₂, metalização com ouro e o microscópio configurado no modo alto vácuo.

Palavras-chave: Metodologia, MEV, Taxonomia, Tardigrada.

ABSTRACT

Existing protocols for processing biological samples for scanning electron microscopy (SEM) usually do not produce good results when applied to tardigrades. This study aimed to test standard protocols for invertebrates in order to obtain better results with samples from this group. The two suggested

protocols describe the preparation steps of the material, such as clamping, form of packaging of the specimens, rinses, post-fixation, dehydration, critical point drying and the manner of use of the SEM. In the "Protocol suggestion A" the material is fixed in 4% formaldehyde, rinses with sodium cacodilato buffer and distilled water, post-fixation with osmium tetroxide, dehydration with acetone, drying the sample to critical point with CO₂, metallization in gold and the microscope configured in high vacuum mode. In the "Protocol suggestion B" the material is fixed in 70% ethanol, the samples are enclosed in capsules closed by meshes without washing steps and post-fixation. Dehydration is performed in ethanol and acetone, critical point drying with CO₂, metallization in gold and the microscope configured to high vacuum mode.

Key words: Methodology, SEM, Taxonomy, Tardigrada.

INTRODUÇÃO

Tardígrados são pequenos metazoários encontrados nos mais diversos ambientes. Sempre dependentes da água para estar no estado ativo, podem ser encontrados associados a musgos, líquens, serrapilheira, sedimento marinho ou lacustre, desde montanhas até o mar profundo (Ramazzotti & Maucci, 1983; Kinchin, 1994).

Devido ao pequeno tamanho (no máximo 1 mm) e hábitos crípticos, sua diversidade ainda é subavaliada (Blaxter *et al.* 2004; Garey *et al.* 2008). Nos últimos anos, têm crescido o interesse a respeito do filo, devido principalmente às pesquisas sobre seus mecanismos de sobrevivência em condições desfavoráveis (Guil &

Cabrero-Sañudo, 2007; Welnicz *et al.* 2011). Quando em criptobiose, tardígrados perdem parte substancial da água corpórea e cessam, quase que completamente, o seu metabolismo. Durante o processo, sintetizam uma série de moléculas (Trehalose, glicerol e "proteínas de choque térmico") que atuam como protetores celulares, estabilizando e conservando seu material genético e tecidos (Bertolani *et al.* 2004).

Compreender os dispositivos envolvidos na criptobiose tem se mostrado um campo promissor, com potencial utilidade biotecnológica (Guil & Cabrero- Sañudo, 2007). Já se sabe que algumas espécies de tardígrados apresentam a capacidade de sobreviver a altas pressões (Ono *et al.* 2008),

temperaturas extremas (Rahm, 1921; Becquerel, 1950), altos níveis de radiação ionizante (May *et al.* 1964), substâncias tóxicas (Ramløv & Westh, 2001) e a um longo período congelado (Tsujimoto *et al.* 2015), sendo, inclusive, levados para órbita terrestre em experimentos de exposição ao vácuo (Rebecchi *et al.* 2011).

Desde a monografia de Ramazzotti & Maucci em 1983, o grupo recebeu inúmeras revisões, expandindo e corrigindo as informações sobre os táxons. Existem vários problemas envolvidos em publicações científicas com taxonomia dos tardígrados, dentre os quais merecem referência as descrições antigas, o detalhamento insuficiente para relatar a variabilidade intraespecífica e as chaves taxonômicas defasadas (Degma *et al.* 2010). Com um plano corporal aparentemente simples, com poucos caracteres morfológicos (Fontoura & Morais, 2011; Nelson & Marley, 2000; Nelson & McInnes, 2002; Pilato & Binda, 2010), uma observação minuciosa a partir de

instrumentos de boa qualidade é fundamental.

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) gera grande profundidade de foco e alta resolução, tornando possível levantamento e ilustração de um grande número de caracteres morfológicos (Castro *et al.* 2002). Apesar do início precoce dos estudos utilizando MEV com tardígrados (Baccetti & Rosati, 1969), trabalhos onde se discute metodologias são escassos (Shively & Miller, 2009). Essas informações frequentemente são restritas aos corredores das universidades, fazendo com que os entusiastas do filo sejam obrigados a galgar laboriosamente por tentativa e erro suas próprias adaptações (Shively & Miller, 2009), ou mesmo, fazer uso de práticas propostas para outros táxons.

Tardígrados apresentam um epitélio delicado com cutícula disposta em três camadas, podendo ser quitinosa ou não (Nelson & Higgins, 1990). Com poucas estruturas rígidas (apenas estilete bucal e garras - ver Ramazzotti & Maucci, 1983), o processo de

preparação das amostras para MEV é consideravelmente trabalhoso quando comparado ao de outros animais, tais como Porifera e suas espículas calcáreas/silicosas (Hadju *et al.* 2011: 57), ou artrópodes de exoesqueleto rígido (Castro *et al.* 2002).

Portanto, sabendo-se das dificuldades envolvidas no processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura, bem como da insuficiente literatura especializada, com esse trabalho pretende-se descrever de maneira sucinta as etapas do processamento das amostras de tardígrados marinhos e limnoterrestres, relatar os problemas a serem enfrentados e sugerir as alternativas menos onerosas no uso das substâncias químicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos espécimes e preparação do material

Os espécimes foram coletados na praia de Cupe (litoral sul de Pernambuco), localizada entre as coordenadas 8° 25' S e 34° 55' W, de onde foram extraídas

amostras de substrato inconsolidado para obtenção dos tardígrados marinhos, e no campus de Dois Irmãos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – lat. 8°00' S; long. 34°08' W, de onde foram retirados musgos aderidos a árvores e telhados para a coleta dos tardígrados limnoterrestres. O material marinho foi fixado em formol salino a 4% ou AFA {etanol a 70% (93%); formol a 37% (5%), ácido acético glacial (2%)}. As amostras de tardígrados limnoterrestres foram fixadas em etanol a 70%.

Para a extração dos tardígrados, efetuou-se lavagens das amostras através de peneiras geológicas sobrepostas seguindo o procedimento indicado por Elmgren (1966). A triagem foi feita em placa de Dollfus com auxílio de estereomicroscópio, tendo como objetivo separar os tardígrados da meiofauna (marinhos) e da briofauna (limnoterrestres) em geral. Aproximadamente 500 espécimes entre marinhos e limnoterrestres foram acondicionados em microtubos do tipo “Eppendorf” com o fixador, quando utilizado.

Seguiram-se as etapas de lavagens dos espécimes sobre lamínulas de microscopia. A princípio, foi testada a utilização de um polímero (Poli-L-Lisina) que ajudaria na aderência dos espécimes na própria lamínula. Foi testada a secagem ao ponto crítico com CO₂ na máquina Baltec 030 CPD (Critical Point Dryer) e também foi testada a imersão em HMDS (hexametildissilazano), como alternativa (Shively & Miller, 2009).

Baseando-se em técnicas utilizadas para pequenos metazoários optou-se por desenvolver cápsulas para imersão dos espécimes nas substâncias utilizadas no processamento das amostras (Mitchell & Miller, 2008). Para a confecção da cápsula de imersão foram utilizadas pipetas

graduadas serradas nas duas extremidades, formando um cilindro, sendo uma das extremidades revestidas por uma malha de 30 µm (ou 44 µm) onde os tardígrados foram dispostos. Testou-se a utilização de material vivo e também fixado.

Os tardígrados acondicionados nos microtubos do tipo “Eppendorf” foram despejados em uma placa de Petri e selecionados para serem observados. Os espécimes foram dispostos sobre a malha com o uso de agulhas histológicas, sendo, em seguida, mantidos abrigados dentro das cápsulas para imersão nas substâncias (Fig. 1). Após esta etapa, a metodologia varia de acordo com o protocolo adotado (ver Tabela I e Tabela II).

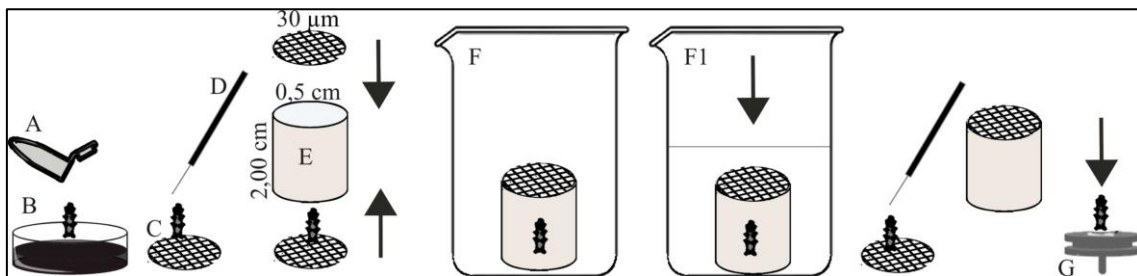


Figura 1- Procedimento de imersão das cápsulas para lavagem e desidratação. A) Microtubo com os espécimes; B) Placa de petri; C) Malha 30/44 µm, onde os espécimes são dispostos; D) Agulha histológica para manipulação dos espécimes; E) Cápsula de imersão; F) Béquer ; F1) Béquer com a solução; G) Suporte para amostras do microscópio (*Stub*).

Tabela I. Protocolo "A" sugerido para confecção de lamínulas para MEV de tardígrados.

Sugestão de Protocolo "A"	
Fixação	Formol 4%
Acondicionamento dos exemplares	Cápsulas com malhas de 30 µm (material vivo) e 44 µm (material fixado)
Lavagens	Água destilada por 10 minutos, seguida por tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 (material limnoterrestre), ou apenas o tampão cacodilato (material marinho)
Pós-fixação	Tetróxido de Ósmio (OsO ₄) 1%
Lavagem	H ₂ O (destilada) 3x 10 min
Desidratação	Séries de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%(3x) por 10-15 minutos cada.
Secagem da amostra	Ponto crítico com CO ₂
Metalização	10 nm de ouro
Modo de utilização do microscópio	Alto vácuo

Tabela II. Protocolo "B" sugerido para confecção de lamínulas para MEV de tardígrados.

Sugestão de Protocolo "B"	
Fixação	Etanol a 70 % (marinho ou limnoterrestre) ou material <i>in vivo</i> (limnoterrestre).
Tratamento prévio	Manter a amostra por pelo menos 5 minutos em água destilada para uma pré-remoção do fixador e distensão dos espécimes.
Acondicionamento dos exemplares	Cápsulas com malhas de 30 µm (material vivo - limnoterrestre) e 44 µm (material fixado – marinho ou limnoterrestre)
Lavagens	X (Etapa suprimida)

Pós-fixação	X (Etapa suprimida)
Lavagem	X (Etapa suprimida)
Desidratação	Séries de etanol a 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%(3x) por 2-3 minutos cada. Em seguida, proceder a três passos de etanol/acetona (33% de acetona + etanol 67%, seguindo-se de: 67% acetona + 33% de etanol, finalizando com a imersão em acetona 100% pelo menos 2 vezes).
Secagem da amostra	Ponto crítico com CO ₂
Metalização	10 nm de ouro
Modo de utilização do microscópio	Alto vácuo

Sugestão de Protocolo A

Iniciou-se com a retirada do fixador, efetuando-se 3 lavagens (das cápsulas) com Cacodilato de sódio [(CH₃)₂AsO₂Na] por 10 minutos cada evento. Após as lavagens, procedeu-se a pós-fixação com uma solução 1:1 [Tetróxido de Ósmio (OsO₄) + tampão fosfato 0,2M], por 30 minutos. Após a pós-fixação, procedeu-se 3 lavagens sucessivas em água destilada, por 10 minutos cada evento, para retirada do fixador. Em seguida, iniciou-se a desidratação do material utilizando acetona em séries de 30%, 50%,

70% e 90% (uma lavagem por cada concentração), completando a desidratação com 3 lavagens em acetona 100% por quinze minutos cada. Todas as lavagens foram efetuadas utilizando béqueres com 50 ml de capacidade como recipiente para imersão das cápsulas com os tardígrados em seu interior (Fig. 1). Por fim, secagem ao ponto crítico (CO₂) – procedimento padrão para MEV. Sugere-se o uso de microscópio estereoscópico para conferir a permanência dos espécimes sobre a malha das cápsulas. Após o ponto crítico com CO₂ os espécimes são

retirados individualmente da superfície da malha com auxílio de agulhas histológicas e colocados diretamente sobre a fita de carbono adesivo (Fig.1) no suporte porta amostras do microscópio (*stub*), tudo isso sob observação em microscópio estereoscópico, verificando o estado de preservação dos organismos. Por fim, o material seguiu para metalização em ouro (10 nm) – procedimento padrão para MEV - e observação no microscópio eletrônico de varredura no modo “alto vácuo” (Tabela I). Depois da obtenção das fotomicrografias no MEV, algumas fotos foram editadas para remoção de artefatos com Corel Draw® versão X5.

Sugestão de Protocolo B

Iniciou-se banhando os espécimes (dentro das cápsulas) em água destilada para retirada do fixador e distensão do corpo por aproximadamente 5 minutos. Em seguida procedeu-se a uma série de desidratação em etanol de 10 etapas (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90% e 100%) mantendo as cápsulas em cada

solução por 2 a 3 minutos. Posteriormente fez-se a imersão das cápsulas três vezes em etanol a 100% por 1 minuto cada. Em seguida, procederam-se três passos de etanol/acetona (uma parte de acetona 33%+ etanol 67%, seguido por etanol 33%+ acetona 67%) Por fim, fez-se a imersão em acetona a 100%, ao menos por duas vezes por 1 minuto cada (Tabela II). Todas as lavagens foram efetuadas nas cápsulas (Fig.1). Em seguida o material seguiu para o ponto crítico e os demais passos foram conduzidos como relatados para a sugestão de protocolo A.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer deste estudo foram testados alguns protocolos pré-existent para microscopia eletrônica de varredura utilizados em variados tipos de materiais biológicos (Amsellem & Clement, 1980; Silveira, 1989; Rebecchi & Guidi, 1991; Melone, 1998; Eibye-Jacobson, 2001; Castro *et al.* 2002; Mitchell & Miller, 2008), quando foi averiguada a eficácia e aplicabilidade para tardígrados de substâncias e metodologias tais

como o uso do fixador (AFA, Formol 4% ou etanol 70%), substâncias para retirada (lavagem) do fixador (tampão fosfato ou tampão Cacodilato de sódio), tempo de desidratação em acetona (5, 10, 15 ou 30 minutos), necessidade do tratamento ultrassônico prévio, secagem ao ponto crítico com CO₂ ou uso do HMDS, utilização da Poli-L-Lisina, metodologia das lavagens sob estereomicroscópio, além dos modos de utilização do microscópio eletrônico de varredura (modo a alto vácuo ou baixo vácuo). Foram feitas modificações frente aos resultados obtidos, que culminaram na elaboração de duas sugestões de protocolos viáveis para utilização com tardígrados, que são aqui apresentadas.

Algumas características do protocolo "B" fazem com que este seja considerado mais viável do que o protocolo "A", tais como: 1) redução nos custos, pois Tetróxido de Ósmio, tampão cacodilato e formol 4% são substâncias de custo relativamente elevado; 2) maior segurança, pois o protocolo "A" requer substâncias tóxicas, de manipulação obrigatória sob capela,

como o Tetróxido de Ósmio; 3) processamento mais rápido (no protocolo "B" parte dos procedimentos foi suprimida e a desidratação ocorre por imersão nas séries de graduação por apenas 2 a 3 minutos em cada evento), reduzindo assim significativamente o tempo: no protocolo A, a duração estimada é de 2h e no protocolo B é em cerca de 30 minutos.

Uma parcela substancial dos espécimes foi perdida (entre 30-40%) em consequência das lavagens. Isto costuma ser um problema quando se trabalha com um material biológico microscópico, como foi observado anteriormente em trabalho utilizando MEV para Rotifera (Amsellem & Clement, 1980).

As lavagens, assim como o ponto crítico, passaram a ser executadas em estruturas manufaturadas, como sugerido para Rotifera (Amsellem & Clement, 1980) e Tardigrada (Mitchell & Miller, 2008). Antes das cápsulas, testou-se a Poli-L-Lisina. Porém, aproximadamente 90% do material foram perdidos com este método, sendo carregados pelos líquidos. A

cápsula de imersão foi uma solução prática e barata adotada ao longo dos testes laboratoriais.

Foi testado também o uso de material *in vivo*. Os espécimes foram coletados e levados vivos para processamento, a princípio foi utilizada na cápsula uma malha de 44 μm , o que resultou na perda de todos os espécimes utilizados, que atravessavam ativamente a malha assim que acondicionados. A questão das fugas foi solucionada quando foi adotada a malha com abertura de 30 μm . Portanto, considera-se este é o tamanho adequado caso seja preciso lidar com espécimes vivos, sendo o uso alternativo da malha de 44 μm indicado apenas para material fixado.

O uso do material *in vivo* não trouxe nenhuma vantagem que compense o maior trabalho empreendido. Para lidar com organismos vivos, as etapas de triagem e conservação (manutenção dos espécimes vivos) requerem maior diligência, uma vez que o material, recém coletado, deve ser imediatamente processado.

Portanto, recomenda-se o uso de material fixado tanto por facilidade de obtenção dos espécimes como por otimização do tempo a ser dedicado às amostras.

Durante a fixação e a confecção das lâminas para microscopia, distorções quanto ao tamanho real das partes moles dos espécimes é um problema recorrente (Eibye-Jacobson, 2001). Como tentativa de superar esses entraves, Pilato (1981) sugere a observação das estruturas esclerotizadas, não deformáveis, como tubo bucal e garras, para análises morfométricas. Para a taxonomia dos tardígrados limnoterrestres as partes esclerotizadas, como as garras, são consideradas o critério mais importante nas identificações em nível de família (Degma *et al.* 2010; Pilato & Binda, 2010). Neste estudo, foram obtidas fotos de boa qualidade das garras dos espécimes limnoterrestres, mesmo quando o restante do corpo não se encontrava em nível similar (Fig. 2).

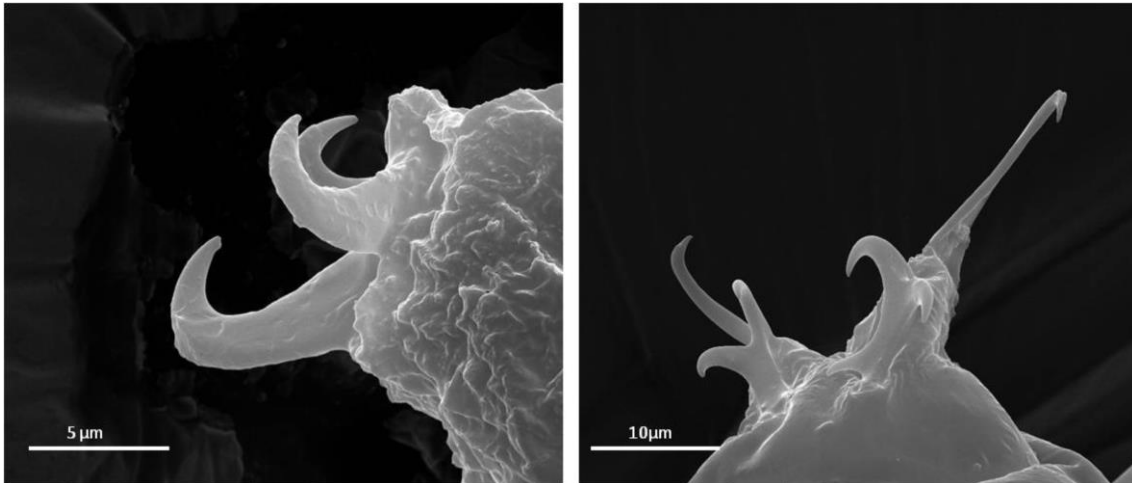


Figura 2 - Fotomicrografia das garras de dois tardígrados limnoterrestres.

A desidratação foi um dos principais problemas no processamento das amostras de Tardigrada para MEV. A substância mais utilizada para a fixação e desidratação em tardígrados tem sido o etanol (Nelson & Higgins, 1990; Nelson, 2001; Nelson & McInnes, 2002), mas atribui-se à acetona uma maior eficiência no momento da secagem ao ponto crítico com CO₂ (etapa que se segue à secagem ao ponto crítico procede-se após a desidratação com acetona ou etanol, quando é feita a substituição desses produtos por gás carbônico liquefeito) (Castro *et al.* 2002).

Na fase final da desidratação, deve-se eliminar o solvente usado (acetona, etanol, etc.), o que muitas

vezes é feito por evaporação. Sabe-se que este procedimento pode causar, em sua fase final, alterações de detalhes superficiais da cutícula dos espécimes devido à tensão superficial. Isto poderia ser minimizado com uso de certos solventes de baixa tensão superficial como o HMDS (Silveira, 1989). Sabendo disso, recorreu-se ao uso HMDS em substituição ao ponto crítico com CO₂. Foram obtidos alguns resultados positivos, porém houve acúmulo de resíduos sobre os espécimes que poderiam dificultar a visualização de estruturas como os poros da cutícula (Fig.3A e Fig.3B). Portanto, ainda que exista na literatura opinião favorável ao seu uso (Shively & Miller, 2009) manteve-se

o uso do ponto crítico com CO₂ como sugestão de protocolo, sendo também o mais frequentemente

usado em tardígrados (Baccetti & Rosati, 1969; Rebecchi & Guidi, 1991; Nelson & McInnes, 2002).

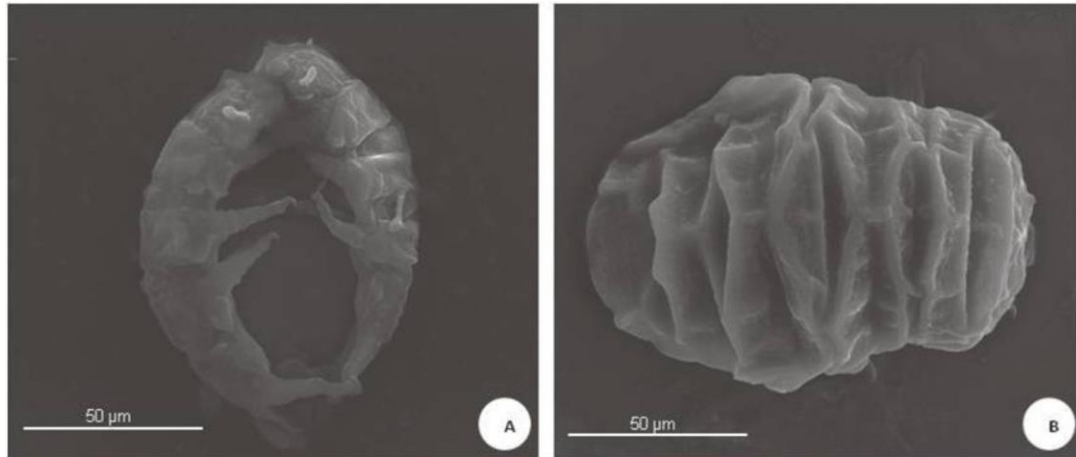


Figura 3 - A) Fotomicrografia de dois espécimes de *Stygarctus bradypus* Schulz, 1951 com uso de HMDS; B) Fotomicrografia de um tonel (espécime em criptobiose) de um tardígrado limnoterrestre.

Na MEV é comum que junto ao organismo fotografado venham artefatos que possam dificultar a compreensão real dos limites e das partes a serem focadas (Eibye-Jacobson, 2001; McInnes, 2001). Portanto, McInnes (2001) sugere o uso de ferramentas que aumentem a qualidade da foto sem interferir na morfologia do organismo (a autora fez uso do Adobe[®] photoshop).

Podem ser utilizados outros programas tais como Picasa[®], Paint e Corel Draw[®] para que as imagens se tornem mais limpas, sempre respeitando os limites e as conformações reais do organismo. Para as fotos aqui detalhadas optou-se pelo Corel Draw[®], versão X5, devido uma maior afinidade dos autores com programa (Fig. 4A e 4B).

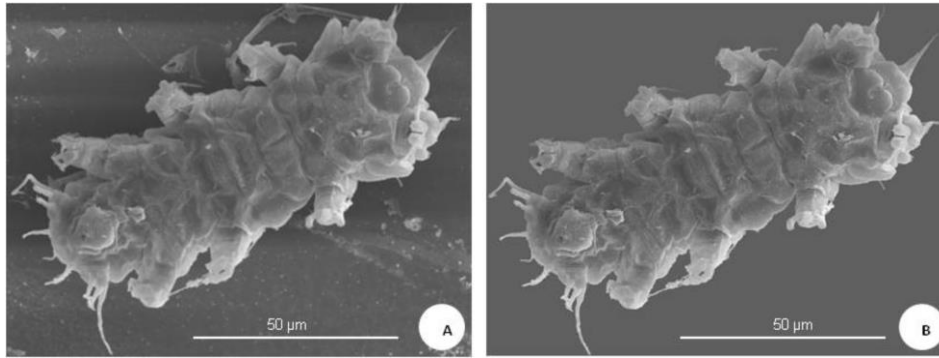


Figura 4. Fotomicrografia de *Batillipes pennaki* Marcus, 1946: A) Antes da edição de imagem; B) Depois da edição de imagem (através do Corel Draw[®], versão X5).

Fotomicrografias de tardígrados limnoterrestres apresentam-se em publicações científicas com qualidade relativamente superior (ver-Michalczyk & Kaczmarek, 2010) ao observado para espécies marinhas (ver- Jørgensen *et al.* 2014). Supõe-se serem estes resultados tanto consequência da morfologia externa dos tardígrados limnoterrestres, menos complexa do que a das espécies marinhas, como também fruto da maior experiência dos pesquisadores, uma vez que há uma ampla dominância de pesquisas em ambientes continentais (Guil & Cabrero-Sañudo, 2007).

CONCLUSÕES

Microscopia eletrônica de varredura com micrometazoários exige destreza para lidar com a

fragilidade das estruturas envolvidas. Desta forma, é importante que sejam realizados estudos piloto com material que possa eventualmente ser descartado, visando a adaptação dos protocolos ao material que se pretende examinar.

Considerou-se que a sugestão de protocolo “A” permitiu a obtenção de bons resultados, embora seja mais dispendiosa sob os aspectos financeiro e temporal. Os resultados foram compatíveis em qualidade com os obtidos através da sugestão de protocolo “B”. Portanto, ambos os procedimentos podem ser utilizados para o estudo de tardígrados tanto limnoterrestres como marinhos, ficando a escolha a critério dos pesquisadores, conforme testes prévios e preferências.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida ao primeiro autor (processo- 139792/2011-2), ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo auxílio técnico e pela inclusão do projeto nas atividades do Laboratório de Microscopia e Microanálise da referida instituição, coordenado pela Dra. Christina Peixoto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amsellem, J. & Clément, P. 1980. A simplified method for the preparation of rotifers for transmission and scanning electron microscopy. **Hydrobiologia** 73: 119-122.

Baccetti, B. & F. Rosati .1969. Electron Microscopy on Tardigrades I. Connective tissue. **Journal of submicroscopic cytology and pathology** .,1: 197 - 205

Becquerel, P. 1950. La suspension de la vie au dessous de 1/20 K absolu par demagnetisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide les plus elève. **Comptes**

rendus de l'Académie des sciences ., Paris, 231: 261-263.

Bertolani, R.; R. Guidetti.; K.I. Jönsson .; T. Altiero.; D. Boschini & L. Rebecchi . 2004. Experiences on dormancy in tardigrades. **Journal of Limnology**, 63 Suppl.: 16-25.

Blaxter, M.; B. Elsworth & J. Daub. 2004. DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an un expected diversity of tardigrades. **Proceedings of the Royal of London Biological** (Suppl.) 271: 189-192.

Castro, L.A.S.; R.M.V. Sanhueza.; R.F.F. Cantillillano & N.E.M. Rocha . 2002. Metodologia para observação da camada de cera em maçãs, utilizando microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 774-775

Degma, P. 2010. **Moss dwelling Tardigrada - from sampling to their identification; European Distributed Institute of Taxonomy EDIT Summer School**. 35p.

Degma, P.; R. Bertolani & R. Guidetti. Actual checklist of Tardigrada species (2009-2015, Ver. 28: 31-03-2015). Disponível em world wide web em:

<http://www.tardigrada.modena.unimod.it/miscellanea/Atual%20checklist%20of%20Tardigrada.pdf> .> Acesso em: Março de 2016.

Eibye-Jacobson, J. 2001. A new method for making SEM preparations of the tardigrade buccopharyngeal apparatus. *Zoologischer Anzeiger- A Journal of Comparative Zoology*, 240, 309–319. <http://doi.org/10.1078/0044-5231-00038>

Elmgren, R.1966. Baltic benthos communities and the role of meiofauna. **Contr. Asko Lab. University of Stockholm**. n.14, p.1-31.

Fontoura, P. & P. Morais . 2011. Assessment of traditional and geometric morphometrics for discriminating cryptic species of the *Pseudechiniscus suillus* complex (Tardigrada, Echiniscidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. doi: 10.1111/j.1439-0469.2010.00594.x

Garey, J.R; S.J. McInnes & P. Brent Nichols. 2008. Global diversity of tardigrades (Tardigrada) in freshwater. **Hydrobiologia** 595: 101 – 106.

Guil, N. & F.J. Cabrero-Sañudo. 2007. Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). **Biodiversity and Conservation**.16: 1063 – 1086

Jorgensen, A.; T.M. Boesgaard .; N. Mobjerg. & R.M. Kristensen. 2014. The tardigrade fauna of Australian marine caves: With descriptions of nine new species of Arthrotardigrada. **Zootaxa**, 3802(4), 401–443. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.3802.4.1>

Kinchin, I. M. 1994. **The biology of tardigrades**. London: Portland Press Ltd.186 p.

Hadju, E.; S. Peixinho & J.C.C. Fernandez. 2011. Identificação de esponjas 57-58. In: **Esponjas marinhas da Bahia: Guia de campo e laboratório**. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 276p. ISBN: 978-85-7427-041-8

McInnes, S. J. 2001. Is It Real? **Zoologischer Anzeiger.**, 240: 467 – 469

Melone, G. 1998. The rotifer corona by SEM. **Hydrobiologia** 387/388: 131-134

- Michalczyk, L. & L. Kaczmarek. 2010. Description of *Doryphoribius dawkinsi*, a new species of tardigrada (Eutardigrada: Hypsibiidae) from the Costa Rican highlands, with the key to the genus *Doryphoribius*. **Zootaxa**, 58(2393), 46–58.
- Mitchell, C. & W. Miller . 2008. A simple SEM (Scanning electron microscope) preparation protocol for tardígrados. **Journal of the Pennsylvania Academy of science**. 81 (2/3): 86-90
- Nelson, D.R & N.J. Marley. 2000. The biology and ecology of lotic Tardigrada. **Freshwater Biology** 44: 93 - 108
- Nelson, D. R. & R.P. Higgins. 1990. Tardigrada. In: DINDAL, D.L. **Soil Biology Guide**. New York: Ed. John Wiley and Sons. p 393-419.
- Nelson, D.R. 2001. Ecology **and classification of North American Freshwater invertebrates**. 2nd ed. Academic press. p 527-550.
- Nelson, D.R. & S.O. McInnes. 2002. Freshwater Meiofauna: **Biology and Ecology**, pp. 177-215.
- Ono, F; M. Saigusa.; T. Uozomi.; Y. Matsushima.; H. Ikeda.; N.L. Saini & M. Yamashita . 2008. Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade. **Journal of physics and chemistry of solids**. 69; 2297-2300.
- Pilato, G. 1981. Analisi di nuovi caratteri nello studio degli Eutardigradi. **Animalia**, 8: 51 – 57.
- Pilato, G. & M.G. Binda .2010. Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification. **Zootaxa**, 2404, 1-54.
- Rahm, G. 1921. Biologische und physiologische Beiträge zur Kenntinis der Moosfauna. **Zeitschrift für Allgemeine Physiologie**, 20: 1 - 35
- Ramazzotti, G. & W. Maucci. 1983. Il phylum Tardigrada (III edizione riveduta e aggiornata). **Memorie de'Il Istituto Italiano di Idrobiologia**. 41:1-1012.
- Ramløv, H. & P. Westh . 2001. Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus (Richtersius) coronifer*: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. **Zoologischer Anzeiger**. 240: 517 - 523
- Rebecchi, L. & A. Guidi. 1991. First SEM studies on tardigrade spermatozoa. **Invertebrate**

reproduction and Development,
19: 151 – 156.

Rebecchi, L.; T. Altiero.; M. Cesari.;
R. Bertolani.; A.M. Rizzo.; P.A.
Corsetto & R. Guidetti. 2011.
Resistance of the anhydrobiotic
eutardigrade *Paramacrobiotus*
richtersi to space flight (LIFE-
TARSE mission on FOTON-M3).
**Journal of Zoological Systematics
and Evolutionary Research**. doi:
10.1111/j.1439-0469.2010.00606.x

Shively, S. & W. Miller. 2009. The
use of HMDS
(hexamethyldisilazane) to replace
Critical Point Drying (CPD) in the
preparation of tardigrades for SEM
(Scanning Electron Microscope)
imaging. **Transactions of the
Kansas academy of science** Vol.
112, no. 3/4 p. 198-200

Silveira, M. 1989. Preparação de
amostras biológicas para
microscopia eletrônica de varredura.
In: **Manual sobre técnicas básicas
em microscopia eletrônica**. São
Paulo: USP. v.1, p.71-79.

Tsujimoto, M.; S. Imura & H.
Kanda. 2015. Recovery and
reproduction of an Antarctic
tardigrade retrieved from a moss

sample frozen for over 30 years.
Cryobiology. 1-4.

Welnicz, W.; M. A. Grohme.; L.
Kaczmarek .; R.O. Schill & M.
Frohme. 2011. Anhydrobiosis in
tardigrades-the last decade.
Journal of Insect Physiology 57
(5),577–583.