Luiza de Oliveira Saad

Morfologia funcional do receptáculo seminal de *Doryteuthis plei* (Blainville, 1823) (Cephalopoda: Loliginidae): decifrando mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual em cefalópodes

Functional morphology of the seminal receptacle in *Doryteuthis plei* (Blainville, 1823) (Cephalopoda: Loliginidae): unraveling postcopulatory sexual selection mechanisms in cephalopods

São Paulo

2016

Luiza de Oliveira Saad

**Morfologia funcional do receptáculo seminal de *Doryteuthis plei*
(Blainville, 1823) (Cephalopoda: Loliginidae): decifrando
mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual em cefalópodes**

Functional morphology of the seminal receptacle in *Doryteuthis plei*
(Blainville, 1823) (Cephalopoda: Loliginidae): unraveling
postcopulatory sexual selection mechanisms in cephalopods

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Amoroso Rodriguez Marian

São Paulo

2016

Resumo

A seleção sexual atua de forma significativa na evolução de características reprodutivas. Os machos apresentam diversas estratégias para garantir a fertilização da fêmea, a qual, por sua vez, possui papel crucial em processos pré- e pós-copulatórios. Nesse contexto, cefalópodes apresentam aspectos reprodutivos peculiares, apresentando transferência de espermatozoides via espermatóforos e, em alguns casos, armazenamento desses gametas em órgãos especializados (i.e., receptáculos seminais). Entretanto, pouco se sabe sobre a morfologia, funcionamento e mecanismos de captação, armazenamento e liberação dos espermatozoides pelos receptáculos seminais. Neste contexto, a presente dissertação teve como objetivo investigar a estrutura e função do receptáculo seminal de *Doryteuthis plei*, espécie de lula adotada como modelo, como base para compreensão de mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual em cefalópodes. Para atingir esse objetivo, a morfologia do receptáculo seminal foi analisada com base em microscopia integrativa (microscopia óptica com emprego de técnicas histoquímicas, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, microscopia confocal e microCT), visando a uma caracterização detalhada da estrutura do órgão. Além disso, a morfologia e histologia/histoquímica do receptáculo seminal foi analisada em três situações experimentais distintas: (1) antes de cópula recente, (2) após cópula recente (e antes da desova) e (3) após a desova, para investigar alterações morfológicas no órgão e no volume de espermatozoides armazenados, como base para compreensão dos mecanismos de captação, armazenamento e liberação de gametas masculinos pela fêmea. Os resultados revelaram enorme complexidade do receptáculo seminal com relação à diversidade de células secretoras e de fibras musculares associadas. Constatou-se que há alteração das células secretoras após a cópula recente e após a desova, com liberação do conteúdo de parte dessas células. Com base nos resultados obtidos, discute-se o papel dessas secreções na captação, armazenamento e liberação de espermatozoides. Além disso, a estrutura dos sistemas nervoso e muscular associados ao receptáculo seminal sugere que a fêmea tenha controle sobre deformações precisas do órgão relacionadas à captação e liberação de espermatozoides. Entretanto, outros mecanismos seriam igualmente possíveis, como atração química, natação ativa dos espermatozoides e ação ciliar do órgão. Alguns receptáculos seminais foram encontrados com espermatângios (i.e., espermatóforos evertidos) bloqueando total ou parcialmente sua abertura. Devido à

frequência, posição e morfologia dos espermatângios dentro do receptáculo seminal, propõe-se a hipótese de que essas estruturas poderiam atuar também como plugues copulatórios. Esses plugues seriam mais eficientes nas primeiras 24 horas, sua eficiência sendo gradualmente reduzida com o tempo após a cópula, devido ao esvaziamento do conteúdo espermático e consequente redução de sua turgidez. Embora plugues copulatórios sejam conhecidos em inúmeras espécies de animais, este é o primeiro registro para cefalópodes, sendo, portanto, marco importante nos estudos de seleção sexual para o grupo. Cefalópodes são considerados modelos interessantes para o estudo de seleção sexual e os resultados desta dissertação contribuem para compreensão dos complexos mecanismos pós-copulatórios em lulas, como escolha críptica da fêmea e competição espermática.

Abstract

Sexual selection exerts a significant pressure on the evolution of reproductive attributes. Males show a diverse array of strategies to gain advantage in mating and fertilization success, but females also play a crucial role in pre- and post-copulatory sexual selection processes. Within this context, cephalopod mollusks show peculiar reproductive strategies, including sperm transfer via spermatophores, and the presence of female sperm-storage organs (seminal receptacles). However, the knowledge of the functioning of the cephalopod seminal receptacles is scarce, the mechanisms involved with sperm uptake, storage and release being unknown. To shed light on post-copulatory mechanisms in cephalopods, the present dissertation aimed at investigating the structure and function of the seminal receptacle of the squid *Doryteuthis plei*. To achieve this goal, the morphology of the seminal receptacle was thoroughly analyzed applying integrative microscopy (light microscopy including histochemical techniques, scanning & transmission electron microscopy, confocal microscopy and microCT). Moreover, to investigate morphological and sperm volume changes associated with possible mechanisms of sperm uptake, storage and release by the organ, the morphology and histology/histochemistry of the seminal receptacle was also analyzed under three distinct experimental manipulations: (1) before recent mating (2) after recent mating (and before egg release) and (3) after egg release. The results show a complex and striking diversity of secretory cells and associated muscle fibers in the seminal receptacle. There were changes in the composition and predominance of secretory cells between major reproductive events, suggesting a secretory activity associated with mating and spawning. The possible roles of these secretions in sperm uptake, storage and release are discussed in light of our data. Moreover, the structure of the nervous and muscular systems associated with the receptacle suggests that females have control over precise deformations of the organ, possibly related to sperm uptake and release. However, other mechanisms would be possible, such as chemical attraction, sperm active swimming, and ciliary action. Seminal receptacles were sometimes found with spermatangia (i.e., everted spermatophores) blocking totally or partially their openings. Given their frequency, position, and morphology, we hypothesize spermatangia might function as copulatory plugs that physically obstruct the female storage organ. Plug efficiency should be high within the first 24 hours after mating, gradually decreasing its efficiency with time, when spermatangia lose their turgidity by releasing part of their sperm content. Although copulatory plugs have been reported for

numerous taxa, this is the first record for cephalopods, and as such this finding has an impact for sexual selection studies based on these mollusks. Cephalopods are considered interesting models to investigate sexual selection, and this study has cast some light on the understanding of complex post-copulatory mechanisms in squids, such as cryptic female choice and sperm competition.

Introdução Geral

Seleção Sexual

A teoria da seleção sexual pressupõe que características que tragam vantagens à reprodução de determinados indivíduos podem ser selecionadas durante o seu processo evolutivo (DARWIN, 1871). Tais características seriam capazes de maximizar a possibilidade de um determinado indivíduo encontrar um parceiro, copular e gerar descendentes férteis. A seleção sexual entre os indivíduos pode ocorrer de forma intrasexual ou intersexual. A primeira atua entre membros do mesmo sexo, como nas disputas entre machos pelo acesso às fêmeas; já a segunda atua entre membros de sexos diferentes, como na escolha de parceiros pelas fêmeas (HOSKEN & HOUSE, 2011; MORENO-GOMEZ et al., 2015).

A seleção sexual é composta por processos pré- e pós-copulatórios (BIRKHEAD & MØLLER, 1998). Dentre os processos pré-copulatórios, há a escolha do parceiro sexual devido à existência de ornamentos atrativos, comportamento de corte, disputa entre machos pelo acesso à fêmea, dominância de um harém, entre outros (DANIELSSON, 2001; ANDERSSON & SIMMONS, 2006; BRENNAN, 2012). Já os processos pós-copulatórios podem ser representados pela remoção física ou diluição dos espermatozoides de cópulas prévias por outros machos, armazenamento de espermatozoides de diferentes machos, depósito de espermatozoides mais próximos do sítio de fertilização, entre outros (BIRKHEAD & MØLLER, 1998). A importância dos processos pós-copulatórios é inegável, pois o sucesso na aquisição de um parceiro pode não resultar necessariamente no sucesso da fertilização dos ovos. Neste caso, os artifícios pós-copulatórios passam a atuar diretamente na seleção sexual dos indivíduos (PARKER, 1970; BIRKHEAD & MØLLER, 1998).

Dentre os processos pós-copulatórios, há a competição espermática, que consiste na competição entre os espermatozoides de dois ou mais machos pela fertilização de um dado conjunto de ovócitos (PARKER, 1970). Vários mecanismos relacionados à competição espermática são conhecidos: machos podem impossibilitar fisicamente a fêmea de estocar espermatozoides de outros machos (e.g., com inserções de plugues; FROMHAGE & SCHNEIDER, 2006); espermatozoides de um macho podem ser mais velozes e formar agregações, elevando seu sucesso reprodutivo (FISHER & HOEKSTRA, 2010); se a fêmea apresenta locais de armazenamento de espermatozoides (i.e., receptáculos seminais ou

espermatecas), a forma como os gametas masculinos são dispostos nesses órgãos pode garantir vantagem a um determinado macho em detrimento de outro (IWATA & SAKURAI, 2007); machos podem ainda apresentar mecanismos de remoção de espermatozoides estocados pela fêmea (WAAGE, 1979; ONO et al., 1989; BIRKHEAD & MØLLER, 1998; PRICE et al., 1999; BIRKHEAD, 2010).

Embora os machos apresentem uma série de estratégias associadas à competição pela geração de descendentes, a “arena” na qual ocorre a competição espermática, geralmente, é no trato reprodutivo feminino ou em outro local de fertilização no corpo da fêmea, permitindo que ela atue na escolha desses espermatozoides (WIGBY & CHAPMAN, 2004). Entretanto, apenas após a década de sessenta as fêmeas foram consideradas como influenciadoras ativas na seleção sexual (THORNHILL, 1983; EBERHARD, 1996; BIRKHEAD & MØLLER, 1998; BIRKHEAD, 2010). A “escolha críptica da fêmea” refere-se à influência da fêmea nos processos pós-copulatórios, que favorecem a utilização dos gametas de um ou mais machos em detrimento de outros, por meio de, por exemplo, interrupção prematura da cópula, dificuldade ao acesso à genitália, transporte de esperma para locais de armazenamento e/ou fertilização, incapacitação/digestão de esperma e rejeição ou remoção de plugues de acasalamento, entre outros (EBERHARD, 1994; PRICE et al., 1999; MILLER & PITNICK, 2003; WIGBY & CHAPMAN, 2004).

Com base no exposto, considera-se que a seleção sexual seja resultado da co-evolução entre os indivíduos de ambos os sexos, i.e., a seleção favoreceria atributos masculinos que aumentassem a probabilidade de gerar descendentes, as fêmeas podendo responder a esses atributos e recuperar o controle sobre a fertilização (BIRKHEAD, 2010). Entretanto, compreender esse complexo processo evolutivo depende de informações das quais não detemos completo conhecimento, por exemplo, os detalhes morfológicos de como a genitália masculina e feminina funcionam durante a transferência de esperma, como os espermatozoides são manipulados dentro da fêmea antes da fertilização, e qual o controle do animal sobre a ovulação, oviposição e armazenamento de espermatozoides (EBERHARD, 2004).

Seleção Sexual em Cefalópodes

Moluscos da classe Cephalopoda apresentam aspectos reprodutivos peculiares e variados dentre seus representantes (ROCHA et al., 2001). Sua reprodução envolve comportamentos de combate entre machos, corte, poligamia e até cuidado parental

(HANLON & MESSENGER, 1996; HANLON, 1998). A transferência de espermatozoides é indireta, por meio de espermatóforos, os quais são transferidos pelo macho geralmente com auxílio de um braço modificado, o hectocótilo (HANLON & MESSENGER, 1996). Durante a transferência à fêmea, os espermatóforos passam por mudanças estruturais, durante o fenômeno conhecido por “reação espermatofórica”, no qual suas túnicas evaginam e formam o espermatângio (i.e., espermatóforo evertido contendo a massa espermática), que se fixa ao corpo da fêmea (MARIAN, 2012a, 2012b, 2014).

Algumas espécies de lulas da família Loliginidae apresentam dois tipos de cópula: a paralela, na qual o macho (geralmente de maior porte, denominado *consort*) deposita espermatóforos dentro da cavidade do manto da fêmea, próximo à abertura do oviduto; e cópula frontal, na qual os espermatóforos são depositados próximos a um receptáculo seminal localizado na membrana peribucal (cópula efetuada geralmente por machos de menor porte denominados *sneakers*; HANLON & MESSENGER, 1996). Em ambos os casos, após a reação espermatofórica, há liberação de espermatozoides a partir dos espermatângios, que podem ser utilizados imediatamente para fertilização dos ovócitos se a fêmea estiver em fase de postura de ovos (MARIAN, 2014). Espermatozoides oriundos de espermatângios depositados na membrana peribucal podem ainda ser armazenados no receptáculo seminal (MARIAN, 2014). Em Decapodiformes (i.e., lulas e sépias), o receptáculo seminal é uma invaginação da membrana peribucal, geralmente ventral à boca, circundada por musculatura circular e secretora de uma substância que mantém os espermatozoides em estado inativo (DREW, 1911; OORDT, 1938).

Dessa forma, no caso de loliginídeos, a fertilização dos ovócitos pode ocorrer por espermatozoides provenientes de três sítios diferentes: próximo à abertura do oviduto, onde espermatozoides de machos *consort* estão presentes; na membrana peribucal, pelos espermatozoides liberados dos espermatângios de *sneakers*; e pelos espermatozoides de *sneakers* armazenados no receptáculo seminal (HANLON & MESSENGER, 1996). Como as fêmeas copulam com vários parceiros durante o período reprodutivo, a competição espermática parece exercer uma pressão importante nessas espécies. Dentre os mecanismos possivelmente associados à competição espermática em lulas, destacam-se aqueles documentados para a espécie *Doryteuthis bleekeri*, na qual foram observadas diferenças morfológicas, de comportamento e de longevidade entre espermatóforos e espermatozoides de *sneakers* e *consorts* (IWATA, et al., 2011; IWATA et al., 2014; HIROHASHI et al., 2016).

O número e a localização dos receptáculos seminais variam dentre as famílias de Decapodiformes. Especificamente, Loliginidae, Sepiidae, Spirulidae, Idiosepiidae e

Bathyteuthidae possuem apenas um receptáculo localizado na região ventral da membrana peribucal (MARIAN, 2014) 2014), ao passo que Ommastrephidae e Thysanoteuthidae apresentam vários receptáculos distribuídos por toda a margem dessa membrana (IKEDA et al., 1993; NIGMATULLIN et al., 1995). A hipótese mais recente sobre o surgimento dos receptáculo seminais, baseada em otimizações de caracteres reprodutivos sobre topologias resultantes de recentes análises filogenéticas, sugere que o órgão surgiu ao menos duas vezes independentemente na evolução de Decapodiformes. Entretanto, o grande número de topologias disponíveis na literatura não permitiu uma resposta única e a grande quantidade de dados faltantes na matriz de caracteres morfológicos utilizada resultou em otimizações ambíguas para uma série de caracteres (MARIAN, 2014).

Existem apenas alguns estudos que examinaram a morfologia e histologia do receptáculo seminal de espécies de Decapodiformes, como *Bathyteuthis berryi* (BUSH et al., 2012), *Idiosepius paradoxus* (SATO et al., 2010), *Sepia officinalis* (HANLON et al., 1999), *Sepia apama* (NAUD et al., 2005), *Todarodes pacificus* (IKEDA et al. 1993), *Doryteuthis pealeii* (WILLIAMS, 1909; DREW, 1911), *Loligo forbesi* (LUM-KONG, 1992) e *Loligo vulgaris* (OORDT, 1938). Entretanto nenhum deles descreveu detalhadamente a estrutura desse órgão (e.g., constituição das células glandulares, organização espacial da musculatura). Consequentemente, a anatomia funcional do receptáculo seminal e possíveis mecanismos de captação de espermatozoides pelo órgão são pouco compreendidos. Sabe-se que, após a reação espermatofórica, os espermatozoides são liberados para o meio externo, porém a forma pela qual esses gametas adentram o receptáculo seminal é desconhecida. Com base em *Bathyteuthis berryi* (Bathyteuthidae), BUSH et al. (2012) sugeriram que a massa bucal da fêmea teria alguma participação na manipulação do espermátangio e, consequentemente, na transferência de esperma para dentro do receptáculo, embora não tenham apresentado evidências sólidas para esse cenário. HANLON et al. (1999), investigando a cópula de *Sepia officinalis* (Sepiidae), sugeriram que a ação do hectocótilo poderia auxiliar a entrada dos espermatozoides no receptáculo, mas concluíram que mais estudos seriam necessários para compreender esse processo. SATO et al. (2010) sugeriram que os espermatozoides poderiam nadar ativamente para dentro do receptáculo seminal em *Idiosepius paradoxus* (Idiosepiidae). Por meio de experimentação *in vitro*, OORDT (1938) demonstrou que não há atração química oriunda do receptáculo de *Loligo vulgaris* (Loliginidae) e levantou a hipótese de que a ação da musculatura associada ao receptáculo poderia prover sucção dos espermatozoides liberados próximos ao órgão.

Apesar de seu papel central em processos pós-copulatórios de seleção sexual, o

funcionamento do trato reprodutor feminino ainda é pouco compreendido em diversas espécies (MILLER & PITNICK, 2003). No caso de cefalópodes, os processos de captação, armazenamento e liberação de espermatozoides são desconhecidos. Consequentemente, mecanismos de escolha críptica da fêmea não foram documentados nesse grupo, embora haja evidências indiretas (SHASHAR & HANLON, 2013; NAUD et al., 2016). A ausência de elementos básicos sobre a morfologia funcional dos receptáculos seminais dificulta a proposição de hipóteses sobre mecanismos de seleção sexual que possam ser efetivamente testadas experimentalmente. Dessa forma, se faz necessário reunir elementos da morfologia que possam elucidar o funcionamento desses órgãos.

Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo geral investigar a estrutura e função do receptáculo seminal de *Doryteuthis plei*, espécie de lula adotada como modelo, como base para compreensão de mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual em cefalópodes. Mais especificamente, o trabalho procurou atingir as seguintes metas:

- Analisar a morfologia do receptáculo seminal com base em microscopia integrativa (microscopia óptica com emprego de técnicas histoquímicas, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, microscopia confocal e microCT), visando a uma caracterização detalhada da estrutura do órgão, incluindo suas células secretoras e os sistemas muscular e nervoso associados;
- Analisar a morfologia e histologia/histoquímica do receptáculo seminal em três situações experimentais distintas: (1) antes de cópula recente, (2) após cópula recente (e antes da desova) e (3) após a desova, para investigar alterações morfológicas no órgão (i.e., conformação interna, modificações na musculatura e aspecto das células glandulares) e volume de espermatozoides, como base para compreensão dos mecanismos de captação, armazenamento e liberação de gametas masculinos pela fêmea.

Organização da Tese

Além desta "Introdução Geral" e das "Considerações Finais", a Dissertação está organizada em dois capítulos estruturados como artigos científicos e redigidos em inglês. As respectivas referências, tabelas e figuras estão apresentadas independentemente ao final de

cada capítulo.

O primeiro capítulo, intitulado “Functional morphology of the seminal receptacle indicates cryptic female choice in the squid *Doryteuthis plei* (Blainville, 1823) (Cephalopoda: Loliginidae)”, reúne as informações obtidas a partir de microscopia integrativa, apresentando uma descrição detalhada da estrutura do receptáculo seminal. Além disso, o manuscrito documenta os resultados das manipulações experimentais e as respectivas análises histológicas.

O segundo capítulo, intitulado “A mating plug in a squid? Sneaker spermatophores blocking the female seminal receptacle in *Doryteuthis plei* (Blainville, 1823)”, apresenta evidências do primeiro registro de plugues copulatórios em lulas, que foram descobertos durante a investigação morfológica realizada no capítulo anterior.

Referências

- ANDERSSON, M; SIMMONS, L. W. Sexual selection and mate choice. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 296-302, 2006.
- BAUR, B. **Sperm competition in molluscs**. In: BIRKHEAD, T. R; MØLLER, A. P. editors. **Sperm competition and sexual selection**. San Diego: Academic Press, 1998. 255-305p.
- BIRKHEAD, T. R. How stupid not to have thought of that: post-copulatory sexual selection. **Journal of Zoology**, v. 281, p. 78-93, 2010.
- BIRKHEAD, T. R.; MØLLER, A. P. **Sperm competition and sexual selection**. London: Academic Press, 1998. 826p.
- BRENNAN, P. Sexual Selection. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n.10, p.79, 2012.
- BUSH, S.; HOVING, H. J. T.; HUFFARD, C.; ROBISON, B. H.; ZEIDBERG, L. D. Brooding and sperm storage by the deep-sea squid *Bathyteuthis berryi* (Cephalopoda: Decapodiformes). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 92, n. 7, p. 1629-1636, 2012.
- DANIELSSON, I. Antagonistic pre-and post-copulatory sexual selection on male body size in a water strider (*Gerris lacustris*). **Proceedings B Royal Society**, v. 268, p. 77-81, 2001.
- DARWIN, C. **The descent of man, and selection in relation to sex**. London: John Murray, 1871. 424 p.
- DREW, G. A. Sexual activities of the squid, *Loligo pealii*. I. Copulation, egg-laying and fertilization. **Journal of Morphology**, v.22, p. 327-359, 1911.
- EBERHARD, W. G. **Female Control: Sexual selection by cryptic female choice**. Chichester, Princeton University Press, 1996. 503p.
- EBERHARD, W. G. Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications for cryptic female choice. **Evolution**, v. 48, n. 3, p. 711-733, 1994
- EBERHARD, W. G. Why study spider sex: Special traits of spiders facilitate studies of sperm competition and cryptic female choice. **Journal of Arachnology**, v. 32, n. 3, p. 545-556, 2004.
- FISHER, H. S.; HOEKSTRA, H. E. Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. **Nature: Letters to Nature**, v. 463, p. 801-803, 2010.

- FROMHAGE, L.; SCHNEIDER J. M. Emasculation to plug up females: the significance of pedipalp damage in *Nephila fenestrata*. **Behavioral Ecology**, v. 17, p.353-357, 2006.
- HANLON, R. T.; MESSENGER, J. B. **Cephalopod Behaviour**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996, 232p.
- HANLON, R.T. Mating systems and sexual selection in the squid *Loligo*: how might commercial fishing on spawning squids affect them?. **California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports**, v. 39, p. 92-100, 1998.
- HANLON, R. T.; AMENTÁ, S. A.; GABR, H. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). **Marine Biology**, v.134, p.719-728, 1999.
- HIROHASHI, N.; TAMURA-NAKANO, M.; NAKAYA, F.; IIDA, T.; IWATA, Y. Sneaker male squid produce long-lived spermatozoa by modulating their energy metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 19324, p. 1-8, 2016.
- HOSKEN, D. J.; HOUSE, C. M. Sexual selection. **Current Biology**, v. 21, n. 2, p. R62-R65, 2011.
- IKEDA, Y.; SAKURAI, Y.; SHIMAZAKI, K. Maturation process of the japanese common squid *Todarodes pacificus* in captivity. **Recent advances in cephalopod fisheries biology**: contributed papers to 1991 CIAC International Symposium and proceedings of the Workshop on Age, Growth and Population Structure, p. 179-187, 1993.
- IWATA, Y.; SAKURAI, Y. Threshold dimorphism in ejaculate characteristics in the squid *Loligo bleekeri*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 345, p. 141-146, 2007.
- IWATA, Y., SHAW, P.; FUJIWARA, E.; SHIBA, E.; KAKIUCHI, Y.; HIROHASHI, N. Why small males have big sperm: dimorphic squid sperm linked to alternative mating behaviours. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 236, p. 1-9, 2011.
- IWATA, Y.; SAKURAI, Y.; SHAW, P. Dimorphic sperm-transfer strategies and alternative mating tactics in loliginid squid. **Journal of Molluscan Studies**, p.1-5, doi:10.1093/mollus/eyu072, 2014.
- LUM-KONG, A. A histological study of the accessory reproductive-organs of female *Loligo forbesi* (Cephalopoda, Loliginidae). **Journal of Zoology**, v. 226, p. 469-490, 1992.
- MARIAN, J. E. A. R. Spermatophoric reaction reappraised: novel insights into the functioning of the loliginid spermatophore based on *Doryteuthis plei* (Mollusca: Cephalopoda). **Journal of Morphology**, v. 273, p. 248-278, 2012a.

- MARIAN, J. E. A. R. A model to explain spermatophore implantation in cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) and a discussion on its evolutionary origins and significance. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 105, p. 711-726, 2012b
- MARIAN, J. E. A. R. Evolution of spermatophore transfer mechanisms in cephalopods. **Journal of Natural History**, v. 49, n. 21-24, p. 1423-1455, 2014.
- MILLER, G. T.; PITNICK, S. Functional significance of seminal receptacle length in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, p. 114-126, 2003.
- MORENO-GOMEZ, F. N.; BACIGALUPE, L. D.; SILVA-ESCOBAR, A. A.; SOTO-GAMBOA, M. Female and male phonotactic responses and the potential effect of sexual selection on the advertisement calls of a frog. **Animal Behaviour**, v. 104, p.79-86, 2015.
- NAUD, M. J.; SHAW, P. W.; HANLON, R. T.; HAVENHAND, J. N. Evidence for biased use of sperm sources in wild female giant cuttlefish (*Sepia apama*). **Proceedings B Royal Society**, v. 272, p. 1047-1051, 2005.
- NAUD, M. J.; SAUER, W. H. H.; MCKEOWN, N. J.; SHAW, P. W. Multiple mating, paternity and complex fertilisation patterns in the chokka squid *Loligo reynaudii*. **PLoS ONE**, v.11, n. 2, e0146995, 2015.
- NIGMATULLIN, C. M.; ARKHIPKIN, A. I.; SABIROV, R. M. Age, growth and reproductive biology of diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* (Oegopsida: Thysanoteuthidae). **Marine Ecology Progress Series**, v. 124, p. 73-87, 1995.
- ONO, T; SIVA-JOTHY, M. T.; KATO, A. Removal and subsequent ingestion of rivals' semen during copulation in a tree cricket. **Physiological Entomology**, v. 14, n. 2, p. 195-202. 1989.
- OORDT, G.J. The spermatheca of *Loligo vulgaris*. I. Structure of the spermatheca and function of its unicellular glands. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 80, p. 593-599, 1938.
- PARKER, G. A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Reviews**, v. 45, p. 525-567, 1970.
- PRICE, C. S. C.; DYER, K. A.; COYNE, J. A. Sperm competition between *Drosophila* males involves both displacement and incapacitation. **Nature: Letters to Nature**, v. 400, p. 449-452, 1999.
- ROCHA, F.; GUERRA, A.; GONZÁLEZ, A. F. A review of reproductive strategies in Cephalopods. **Biological Reviews**, v. 76, p. 291-304, 2001.

- SHASHAR, N; HANLON, R. T. Spawning behavior dynamics at communal egg beds in the squid *Doryteuthis (Loligo) pealeii*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 447, p. 65-74, 2013.
- SATO, N.; KASUGAI, T.; IKEDA, Y.; MUNEHARA, H. Structure of the seminal receptacle and sperm storage in the japanese pygmy squid. **Journal of Zoology**, doi: 10.1111/j.1469- 7998.2010.00733.x, 2010.
- THORNHILL, R. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. **The American Naturalist**, v. 122, n. 6, p. 765-788. 1983.
- WAAGE, J. K. Dual function of the damselfly penis: sperm removal and transfer. **Science**, v. 203, p. 916-918, 1979.
- WIGBY, S.; CHAPMAN, T. Sperm competition. **Cell Press, Current Biology**, v. 14, n. 3, p. R100-R103, 2004.
- WILLIAMS, L. W. **The anatomy of the common squid *Loligo pealei***. Holanda: E. J. Brill, Leiden, 1909. 92p.

Considerações Finais

A presente dissertação objetivou compreender a função do receptáculo seminal da lula costeira *Doryteuthis plei* e investigar se esse órgão de armazenamento de espermatozoides está envolvido em mecanismos pós-copulatórios de seleção sexual. Apesar de haver estudos morfológicos acerca do receptáculo seminal de cefalópodes (WILLIAMS, 1909; DREW, 1911; OORDT, 1938; LUM-KONG, 1992; IKEDA et al., 1993; HANLON et al., 1999; NAUD et al., 2005; SATO et al., 2010; BUSH et al., 2012; MARIAN, 2012), a estrutura desse órgão é em geral pouco detalhada, dificultando a compreensão de mecanismos de captação, armazenamento e liberação de espermatozoides pelo órgão, bem como sua influência em aspectos de seleção sexual, como escolha críptica da fêmea e competição espermática.

Dessa forma, a primeira parte da dissertação consistiu em analisar detalhadamente a morfologia do receptáculo seminal a partir da integração de diversas técnicas de microscopia (óptica, eletrônica, confocal e microCT) e pela análise da estrutura do órgão em três situações distintas (i.e., antes e após cópula recente e após a desova) obtidas a partir de manipulações experimentais. Os resultados revelaram enorme complexidade do receptáculo seminal com relação à diversidade de células secretoras e de fibras musculares associadas. Constatou-se que há alteração das células secretoras após a cópula recente e após a desova, com liberação do conteúdo de parte dessas células. Com base nos resultados obtidos, discute-se o papel dessas secreções na captação, armazenamento e liberação de espermatozoides. Além disso, a estrutura dos sistemas nervoso e muscular associados ao receptáculo seminal sugere que a fêmea tenha controle sobre deformações precisas do órgão relacionadas à captação e liberação de espermatozoides. Entretanto, outros mecanismos seriam igualmente possíveis, como atração química, natação ativa dos espermatozoides e ação ciliar do órgão (OORDT, 1938; HANLON et al., 1999; SATO et al., 2010). Neste trabalho, foi possível ainda observar que o volume de espermatozoides armazenados apresentou grande variação dentro dos experimentos “após cópula recente” e “após a desova”, sugerindo algum mecanismo de seleção de espermatozoides para armazenamento e fertilização, respectivamente. Como diversas questões acerca do funcionamento e papel do órgão permanecem enigmáticas, sugere-se a expansão desses estudos a outras espécies de lulas e sépias que apresentam receptáculos, bem como a continuidade das investigações baseadas em manipulações experimentais, associadas também a análises de paternidade.

Durante o estudo da morfologia do órgão, alguns receptáculos seminais foram encontrados com espermatângios bloqueando total ou parcialmente sua abertura, possivelmente obstruindo a entrada ou saída de espermatozoides. A segunda seção da dissertação abordou essa questão com base em análises de microCT e análises histológicas de espécimes oriundos das manipulações experimentais da seção anterior. Devido à frequência, posição e morfologia dos espermatângios dentro do receptáculo seminal, propõe-se a hipótese de que espermatângios de machos *sneaker* poderiam atuar como plugues copulatórios. Esses plugues seriam mais eficientes nas primeiras 24 horas, sua eficiência sendo gradualmente reduzida com o tempo após a cópula, devido ao esvaziamento do conteúdo espermático e consequente redução de sua turgidez. A ocorrência de espermatângios bloqueando a abertura do receptáculo seminal é frequente, inclusive em diferentes situações experimentais (antes e após cópula recente e depois de desova), sugerindo que esse fenômeno deva influenciar inúmeros aspectos pós-copulatórios (e.g., competição espermática, conflito sexual). Embora plugues copulatórios sejam conhecidos em inúmeras espécies de animais (e.g., PARKER, 1970; DEVINE, 1975; BAUMGARD et al., 1982; TONER et al., 1987; BAUER & MIN, 1993; LUNG & WOLFNER, 2001; DIXSON & ANDERSON, 2002; BRETMAN et al., 2010), este é o primeiro registro para cefalópodes, sendo, portanto, marco importante nos estudos de seleção sexual para o grupo. Futuros estudos devem focar na confirmação do papel e eficiência desses espermatângios como plugues, a partir, por exemplo, de investigações com base em experimentação associada a análises de paternidade.

Em suma, o receptáculo seminal de *D. plei* revelou-se mais complexo do que o que havia sido documentado até então para cefalópodes. Isso se deve, possivelmente, à aplicação de distintas ferramentas de análise morfológica e ao caráter experimental deste trabalho. Cefalópodes são considerados modelos interessantes para o estudo de seleção sexual e os resultados desta dissertação contribuem para compreensão dos complexos mecanismos pós-copulatórios em lulas, como escolha críptica da fêmea e competição espermática.

Referências

- BAUER, R. T.; MIN. L. J. Spermatophores and plug substance of the marine shrimp *Trachypenaeus similis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae): formation in the male reproductive tract and disposition in the inseminated female. **Biological Bulletin**, v. 185, p.174-185, 1993.

- BAUMGARDNER, D. J.; HARTUNG, T. G.; KIMSAWREY, D.; WEBSTER, D. G.; DEWSBURY, D. A. Muroid copulatory plugs and female reproductive tracts: a comparative investigation. **Journal of Mammalogy**, v. 63, n. 1, p. 110-117, 1982.
- BRETMAN, A.; LAWNICZAK, M. K. N.; BOONE, J.; CHAPMAN, T. A mating plug protein reduces early female remating in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 107-113, 2010.
- BUSH, S.; HOVING, H. J. T.; HUFFARD, C.; ROBISON, B. H.; ZEIDBERG, L. D. Brooding and sperm storage by the deep-sea squid *Bathyteuthis berryi* (Cephalopoda: Decapodiformes). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 92, n. 7, p. 1629-1636, 2012.
- DEVINE, M.C. Copulatory plugs in snakes: enforced chastity. **Science**, v. 187, p. 844-845, 1975.
- DIXSON, A. F; ANDERSON, M. J. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. **Folia Primatol**, v. 73, p. 63-69, 2002.
- DREW, G. A. Sexual activities of the squid, *Loligo pealii*. I. Copulation, egg-laying and fertilization. **Journal of Morphology**, v.22, p. 327-359, 1911.
- HANLON, R. T.; AMENTÁ, S. A.; GABR, H. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). **Marine Biology**, v.134, p.719-728, 1999.
- IKEDA, Y.; SAKURAI, Y.; SHIMAZAKI, K. Maturation process of the japanese common squid *Todarodes pacificus* in captivit. **Recent advances in cephalopod fisheries biology**: contributed papers to 1991 CIAC International Symposium and proceedings of the Workshop on Age, Growth and Population Structure, p. 179-187, 1993.
- LUM-KONG, A. A histological study of the accessory reproductive-organs of female *Loligo forbesi* (Cephalopoda, Loliginidae). **Journal of Zoology**, v. 226, p. 469-490, 1992.
- LUNG, O.; WOLFNER, M. F. Identification and characterization of the major *Drosophila melanogaster* mating plug protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 543-551, 2001.
- MARIAN, J. E. A. R. Spermatophoric reaction reappraised: novel insights into the functioning of the loliginid spermatophore based on *Doryteuthis plei* (Mollusca: Cephalopoda). **Journal of Morphology**, v. 273, p. 248-278, 2012.
- NAUD, M. J.; SHAW, P. W.; HANLON, R. T.; HAVENHAND, J. N. Evidence for biased use of sperm sources in wild female giant cuttlefish (*Sepia apama*). **Proceedings B Royal Society**, v. 272, p. 1047-1051, 2005.

- OORDT, G.J. The spermatheca of *Loligo vulgaris*. I. Structure of the spermatheca and function of its unicellular glands. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 80, p. 593-599, 1938.
- PARKER, G. A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Reviews**, v. 45, p. 525-567, 1970.
- SATO, N.; KASUGAI, T.; IKEDA, Y.; MUNEHARA, H. Structure of the seminal receptacle and sperm storage in the japanese pygmy squid. **Journal of Zoology**, doi: 10.1111/j.1469- 7998.2010.00733.x, 2010.
- TONER, J. P.; ATTAS, A. I.; ADLER. A. T. Transcervical sperm transport in the rat: the roles of pre-ejaculatory behavior and copulatory plug fit. **Physiology & Behavior**, v. 39, p. 371-375, 1987.
- WILLIAMS, L. W. **The anatomy of the common squid *Loligo pealei***. Holanda: E. J. Brill, Leiden, 1909. 92p.