

MICROANATOMIA E CITOLOGIA DAS GLÂNDULAS PENÇONHENTAS DE *RHINOCRICUS PADBERGII* (DIPLOPODA)¹

RUDOLF BARTH

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

(Com 13 figuras e 13 fotos no texto)

Em continuação dos nossos estudos sobre as glândulas peçonhentas dos Artrópodos, apresentamos, neste trabalho, os resultados das nossas observações a respeito da microanatomia e histologia das chamadas “glândulas repugnatórias” de um Diplópode (*Rhinocricus padbergii*). Encontra-se em cada segmento duplo um par de glândulas que desembocam quase na linha lateral de cada lado. Uma glândula consta de um canal condutor com aparelho de fechamento e com a citada abertura na linha lateral, e de uma vesícula que funciona como reservatório das secreções e cuja parede é formada por um epitélio simples, que é glandular, sendo este revestido externamente por uma membrana basal, muito forte, e internamente por uma lamela de substância cuticular.

A respeito desta glândula, especialmente sobre a composição química da secreção e suas propriedades, já foi publicada uma série de resultados em comunicações das quais algumas serão discutidas nos parágrafos seguintes. Como diversos autores mostraram, a secreção contém componentes tóxicos, diferentes nas diversas espécies, sendo assim esta “glândula repugnatória” caracterizada como “glândula peçonhenta”. Em alguns laboratórios do nosso Instituto, estudam-se, atualmente, a composição química da secreção, sua toxicologia e sua farmacologia, de modo que o estudo histológico detalhado da glândula é de interesse maior.

A descrição da anatomia do aparelho glandular de várias espécies de Diplópodes já foi comunicado por numerosos autores. TREVIRANUS (1817) considerou as aberturas externas da glândula como espiráculos

¹ Recebido para publicação a 20 de dezembro de 1966.

Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz (Divisão de Zoologia, Seção de Entomologia).

do sistema respiratório, sendo êle porém, em 1828, corrigido por SAVI que reconheceu a função verdadeira destas aberturas. Outros autôres, como BURMEISTER (1834), LEYDIG (1855) e VOGES (1878), classificaram os órgãos em questão como aparelhos glandulares. Uma descrição mais detalhada encontramos no trabalho de WEBER (1882) sôbre a microanatomia do complexo glandular de uma espécie do gênero FONTARIA. Êste autor, porém, não comunica resultados histológicos e citológicos novos em comparação com os conhecimentos sôbre as glândulas, conhecidos naquela época, com excessão da sua observação da presença de "grânulos refringentes de tamanho variável, que não são nada mais do que gotículas de secreção de tamanho muito reduzido"; uma observação que não foi feita por autôres mais antigos. É de interêsse notar que LEYDIG (1857) já observou o fato que a secreção não reage à adição de ácido acético, "mas que se torna verde escura depois da adição de hidróxido de potássio", observações estas que se referem a *Julus terrestris* e *Julus sabulosus*; êste fato foi comunicado também por ROSSI (1903) a respeito de *Julus communis*. Em nossa espécie, *Rhinocricus padbergii*, constatamos o mesmo fato, apenas que a côr natural, vermelha intensa, da secreção, sob a reação de hidróxido de potássio, passa para azul escura. No trabalho de WEBER (1882), tratando-se de uma espécie próxima de *Fontaria gracilis*, cita-se um "anel de músculos circulares" que deveria funcionar como uma forma de esfíncter. Não foi encontrado nenhum músculo circular no aparelho glandular em várias espécies estudadas por nós; também na bibliografia, na antiga bem como na mais moderna, não é mencionada qualquer musculatura. Apenas ATTEMS (1930), no seu resumo sôbre os atuais conhecimentos sôbre Diplópodes, menciona um esfíncter em *Polydesmus* e *Orthomorpha*, porém sem indicação da fonte bibliográfica.

WEBER (1882) considera os revestimentos externo e interno do epitélio glandular de "natureza quitinosa". Tratando-se porém, no aparelho glandular inteiro de uma formação ectodermal (veja abaixo), êste revestimento externo, chamado por WEBER e outros autôres como "membrana própria" é um elemento homólogo à membrana basal da hipoderme; em cortes favoráveis observa-se facilmente a transgressão da membrana basal da hipoderme do esqueleto para a membrana basal do epitélio glandular.

A camada muscular externa da vesícula glandular, descrita por HEATHCOTE (1888), não foi observada em nosso material de estudo e, também, não foi mencionada por nenhum dos autores anteriores. Êste autor escreve sôbre o desenvolvimento ontogenético dêste órgão em *Julus terrestris*: "The stink glands are formed as invaginations of the epiblast, and a second coat (muscular) is added later in the development".

Também os trabalhos de SILVESTRI (1902) e de ROSSI (1903) sôbre *Julus communis* não oferecem maiores detalhes a respeito da formação intracelular das secreções, ou ainda outras observações histoló-

gicas e citológicas, sendo porém a anatomia e a morfologia bem apresentadas. O resumo mais recente dos nossos conhecimentos das glândulas peçonhentas dos Diplópodes encontramos na monografia de ATTEMS (1930). Os trabalhos de EISNER *et col.* (1963 a + b) contêm apenas fatos anatômicos e histológicos, já conhecidos por outros autores anteriores, servindo apenas como recapitulação necessária para as excelentes pesquisas bioquímicas dêste grupo de trabalho.

Numerosos autores tratam, exclusivamente, das descrições de casos de envenenamento pela secreção das glândulas laterais dos Diplópodes, incluindo apresentações abreviadas dos fatos anatômicos, já conhecidos de autores anteriores, sem entrar em detalhes a respeito da estrutura mais fina da glândula. Uma outra série de trabalhos sôbre êstes órgãos dedica-se a estudos químicos que foram realizados a respeito da secreção.

Para orientação sôbre a bibliografia dêste assunto, aconselha-se consultar a publicação de EISNER *et col.* (1963 a).

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie, estudada por nós a respeito das glândulas peçonhentas, é a *Rhinocricus padbergii*. Segundo ATTEMS (1930), a espécie pertence a um gênero de vasta distribuição, que se encontra desde a América Central, inclusive das Antilhas e Bermudas, até Paraguai, sendo porém observada também nas Molucas, ilhas Fidschi, em Nova Guinéa e na Austrália. A família dos *Rhinocricidae* pertence à ordem *Juliformia* (*Proterandria eugnatha*) que, a respeito das glândulas peçonhentas é caracterizada pelo ducto excretor simples. Ao contrário disto, na ordem de *Polydesmoidea*, tôdas as espécies possuem um reservatório ou vestíbulo, bem acentuado, como descrito por EISNER *et col.* (1963 a) em *Aphelaria corrugata* (Wood), uma espécie desta última ordem. Nossa espécie é uma das mais freqüentes das formas maiores de Diplópodes no Rio de Janeiro. Sua criação é fácil em madeira decomposta e fôlhas, sendo em geral, alimentado por cenouras, abóbora ou bananas.

Os animais foram decapitados e divididos em pedaços de 4 a 5 segmentos duplos. Depois, remove-se facilmente o intestino sem forçar por meio de uma pinça, de modo que a microtomagem não é mais dificultada por partículas resistentes do conteúdo intestinal. Estas seções do corpo foram colocadas diretamente nos fixadores como: mistura alcoólica, segundo Bouin — Duboscq — Brasil, Susa, segundo Heidenhain, líquido de Carnoy e ácido ósmico a 1% em ácido crômico a 1,1%. Depois de uma ligeira pré-fixação (15 a 30 minutos) as seções cilíndricas do corpo foram cortadas, ao longo das linhas laterais, e pequenas porções do integumento, junto com as glândulas, foram isoladas e fixadas convencionalmente. É importante, decapitar os animais antes da fixação, sem aplicar éter, clorofórmio ou outros anestésicos, para evitar que as vesículas glandulares sejam esvaziadas pela contração da musculatura geral

do corpo (choque de fixação). Este vazamento não ocorre devido à decapitação, pois após abrir a cavidade do corpo, não se pode formar uma pressão no interior. As séries de cortes foram coradas pelos métodos histológicos convencionais. Citamos a seguinte coloração múltipla que fornece bons contrastes e pode ser aplicada com boa segurança: Coloração com hematoxilina férrica, diferenciar em alúmen de ferro até, no núcleo, apenas os nucléolos aparecerem pretos. Interromper a diferenciação e lavar por 2 — 4 horas em água corrente. Segunda coloração em "Kernechtrot" (nuclear fast red) (30 minutos em 60°C) e, depois, em verde naftol ou verde luz (0,1% em álcool a 96%) durante 15 minutos. Resultado: Cromatina vermelha; ficando pretos nucléolos, tonofibrilas e estrias anisotrópicas da musculatura; protoplasma e derivados verde e verde-cinza; cutícula vermelha. Para contrastar, ainda mais, cutícula e musculatura, usamos, antes da coloração com verde naftol, vermelho Congo e Orange GG (solutos saturados em álcool a 60%), misturados em partes iguais.

A preparação das glândulas é feita também em seções do animal decapitado. Depois de ter extirpado o intestino, corta-se o cilindro restante nas suas linhas dorsal e ventral. Assim é fácil de separar os anéis de cada segmento, um do outro, e em seguida, sempre mergulhado os objetos em soluto fisiológico (0,7% NaCl e 0,3% KCl), isolar as glândulas. As vesículas glandulares encontram-se bem acentuadas nas linhas laterais, incluídas na massa clara do corpo gorduroso e da musculatura em virtude da sua cor vermelha intensa.

Depois da fixação com "Susa", segundo Heidenhain, a cutícula mesmo dos animais adultos, não oferece dificuldades ao cortar no micrótomo; após as outras fixações precisa-se aplicar o "diafanol" ácido nítrico e dióxido de cloro, na proporção de 1:10. Os desenhos foram feitos com auxílio do aparelho de desenho (Zeiss-Oberkochen). Para obter luz polarizada no microscópio, usamos placas "Polaroid", cortadas em formas adequadas e colocadas na placa de vidro horizontal giratória, embaixo do condensador, e em uma janela não ocupada do portador de filtros de blocagem para luz ultravioleta no "Ortholux" (Leitz-Wetzlar). As fotografias foram tomadas com a câmara fotográfica automática "Orthomat" (Leitz-Wetzlar).

ANATOMIA DA GLÂNDULA

Os resultados das nossas observações a respeito da anatomia da glândula, não diferem muito dos de outros autores, citados na introdução. Descreveremos a estrutura do aparelho glandular pelo esquema da figura 1, entrando em detalhes apenas em alguns pontos necessários para a melhor compreensão da função do órgão.

Cada lado de um segmento duplo possui uma glândula, situada aproximadamente na linha lateral, sendo ausente nos primeiros 4 segmentos. No quinto segmento, a glândula, às vezes, encontra-se apenas

em um dos lados, em casos raros pode faltar nos dois lados. O sistema glandular abre-se, na linha lateral do metazonito, por uma abertura redonda ou ligeiramente oval, em forma de um funil, externamente não protegida (foto 1). O canal condutor das secreções, que atravessa a cutícula grossa, está inclinado para trás (fotos 2, 3, 4 e 5).



FOTO 1



FOTO 2



FOTO 3

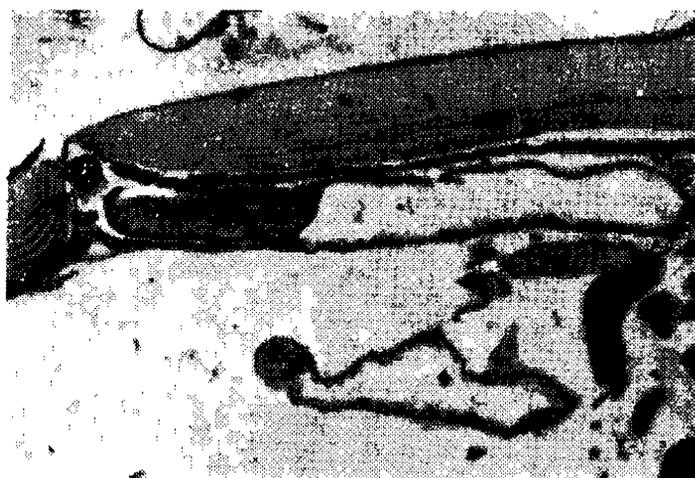


FOTO 4



FOTO 5



FOTO 6

Foto 1 — Abertura externa do aparelho glandular; foto 2 — Corte transversal do canal condutor (luz semi-polarizada). Embaixo: a vesícula glandular colabida; foto 3 — Canal condutor com pistão de fechamento, em corte longitudinal (luz polarizada); foto 4 — Canal condutor com o pistão de fechamento, em corte transversal (luz de xenônio). Embaixo: a vesícula glandular colabida; foto 5 — O mesmo corte como na foto 4, em luz polarizada; foto 6 — Preparação total do canal condutor sem aparelho de fechamento, em luz semi-polarizada para mostrar as dobras anulares de refôrço.

Cada aparelho glandular compõe-se de uma vesícula volumosa, porém delicada, de um canal condutor cilíndrico e de um aparelho de fechamento, situado dentro deste canal. Interpretamos todo o sistema como sendo uma invaginação da cutícula, sendo a abertura do canal condutor o lugar da invaginação. A composição do órgão inteiro é apresentada na figura 1.

a) Vesícula glandular.

A parte secretora da glândula é uma vesícula esférica, muito delicada, (fig. 1; VES) com um diâmetro de, aproximadamente, 800 μ . Esta e as seguintes medições baseam-se em animais adultos de um comprimento total de 8,0 a 8,5 cm. Dissecando-se o animal, a vesícula sempre aparece repleta, cheia de líquido de cor vermelho brilhante.

Observamos que durante e imediatamente após a muda da cutícula, a quantidade de secreções contidas na vesícula é consideravelmente maior do que em exemplares com esqueleto fortemente calcificado. Estes animais, quando irritados, soltam imediatamente a peçonha enquanto que os outros expulsam o líquido, apenas, raras vezes. Isto leva-nos a crer que uma das funções principais da secreção é a proteção a animais não protegidos e, mais ou menos, imóveis na época da muda.

Apesar da delicadeza da sua parede, a vesícula é relativamente resistente, de modo que a glândula isolada suporta a pressão de uma lamínula microscópica normal, sem arrebentar. Correspondendo ao seu diâmetro, ela contém 0,268 mm³ de conteúdo. Este líquido está sofrendo uma pressão constante, mesmo quando se prepara a glândula inteira, inclusive o aparelho de fechamento. Perfurando-se a vesícula com uma agulha, a secreção vermelha é parcialmente expulsa. Supomos, assim, que a parede da vesícula é extremamente elástica, pois não contém elementos musculares, fato confirmado também pela maioria dos outros autores. A parede consta de um epitélio simples, sendo este revestido, no seu lado interno, por uma lamela cuticular de uma espessura de 0,8 — 0,9 μ (fig. 1; CUL), e separado da cavidade do corpo por uma membrana basal de 0,6 — 0,7 μ de espessura (BM). Estas propriedades não podemos encontrar na lamela cuticular, porque esta, correspondendo ao estado de função das células, às vezes é dobrada ou projetada para dentro da vesícula. Ao contrário disto, a membrana basal sempre está estendida e nunca forma dobras; além disto, ela é relativamente espessa. A elasticidade da parede é causada pela micro-estrutura da sua membrana basal. Este problema pode ser investigado apenas por estudos no microscópio eletrônico.

b) Canal condutor.

O canal condutor é um cilindro com 615 μ de comprimento e um diâmetro médio interno de 130 μ (fig. 1; CA). Sua parede é formada

por uma camada cuticular, relativamente grossa, mostrando dobras circulares, irregulares, mas profundas (fig. 1). Esta cutícula é reves-

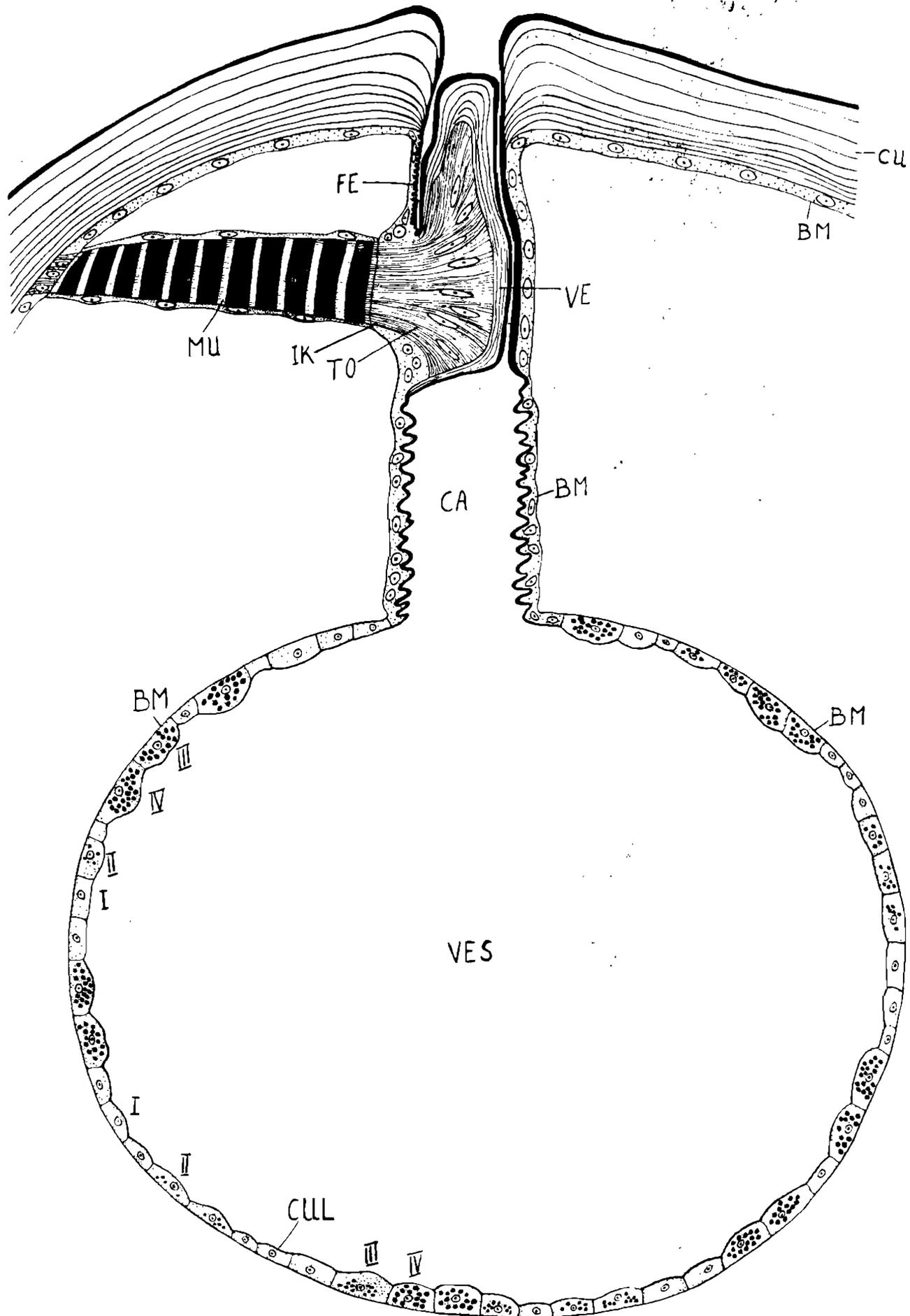


Fig. 1 — Esquema da estrutura do aparelho glandular em corte longitudinal. BM — Membrana basal; CA — Canal; CU — Cutícula; CUL — Lamela cuticular da vesícula glandular (VES); FE — Parte elástica da parede do Canal; IK — Cone de inserção; MU — Músculo do Aparelho de fechamento; TO — Tonofibrilas; VE — Aparelho de fechamento; I — IV — 1.º — 4.º estágio de função das células glandulares.

tida externamente por um sincício hipodérmico típico (fig. 2), sendo este separado da cavidade geral do corpo por uma membrana basal forte, que não acompanha as dobras da cutícula. Em virtude desta construção, a parede do canal, ganha uma resistência mecânica muito elevada, de modo que, na ocasião de um aumento da pressão na hemolinfa, a obstrução do canal é evitada. Entre o canal e a vesícula não se encontra um mecanismo de fechamento; assim, as duas cavidades servem como reservatório da secreção. O canal possui um conteúdo de $0,08 \text{ mm}^3$; o reservatório inteiro contém finalmente $0,276 \text{ mm}^3$ de líquido.

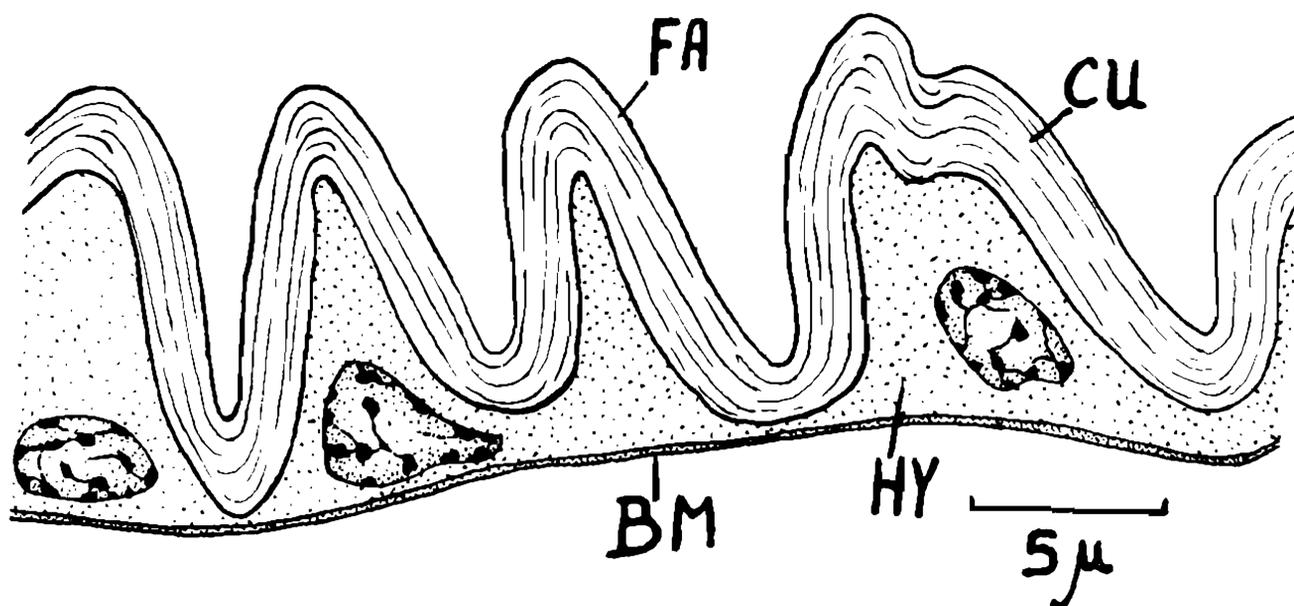


Fig. 2 — Seção da parede do canal condutor. BM — Membrana basal; CU — Cutícula; FA — Dobras; HY — Hipoderme. Semi-esquemático.

c) Aparelho de fechamento.

Na extremidade distal do canal, antes da abertura externa do complexo glandular, situa-se um aparelho de fechamento complicado (fig. 1; VE), que interpretamos como modificação da parede do canal. Esta, perto da abertura externa, forma, no seu lado ventral, uma invaginação volumosa (fig. 1; VE) que preenche o canal inteiro, possuindo um anexo mais ou menos cilíndrico que, como uma rólha, fecha herméticamente a extremidade distal do canal. Este dispositivo é formado por uma cutícula grossa, de modo que sua configuração não pode ser deformada. No lado dorsal, a parede do canal, bem como a parte oposta da rólha de fechamento, são completamente lisas. Em direção à abertura, o canal estreita-se ligeiramente. A forma da rólha adapta-se a esta forma, sendo a última impossibilitada de sair pela abertura. Este dispositivo fecha, em estado de repouso, completamente o sistema glandular (fotos 3, 4 e 7). Em corte transversal, o aparelho de fechamento aparece em forma de meia lua (foto 8).

Na cavidade da invaginação penetra um músculo forte que se estende, em direção lateroventral, dentro do grande anel muscular segmental, prolongando-se sobre uma distância de 1225μ até sua inserção na parede do corpo. Em estado de contração, o comprimento deste músculo foi medido com 821μ , ou sendo $2/3$ do seu comprimento em repouso. É de interesse notar que o grau de contração, com aproximada-

mente 33%, corresponde às contrações musculares máximas em muitos artrópodes, medidas por nós. Toda a cavidade de invaginação é preenchida por um epitélio simples, porém muito alto, sendo este atravessado por feixes compostos por tonofibrilas (fig. 1; TO). Estes reúnem-se em um só feixe e saem da cavidade da invaginação, empurrando ainda a membrana basal para fora, formando-se assim um cone no qual se insere o citado músculo (foto 8; fig. 1; IK).

Entre a invaginação e a abertura externa do sistema glandular, a parede do canal, no seu lado ventral, sofreu uma modificação especial (fig. 1; FE): A cutícula desta região forma numerosas dobras anulares que, ao contrário das dobras circulares do canal (fig. 2), são preenchidas por uma massa epicuticular que, como um cimento, cola as dobras uma a outra (fig. 3). Esta formação estende-se apenas sobre

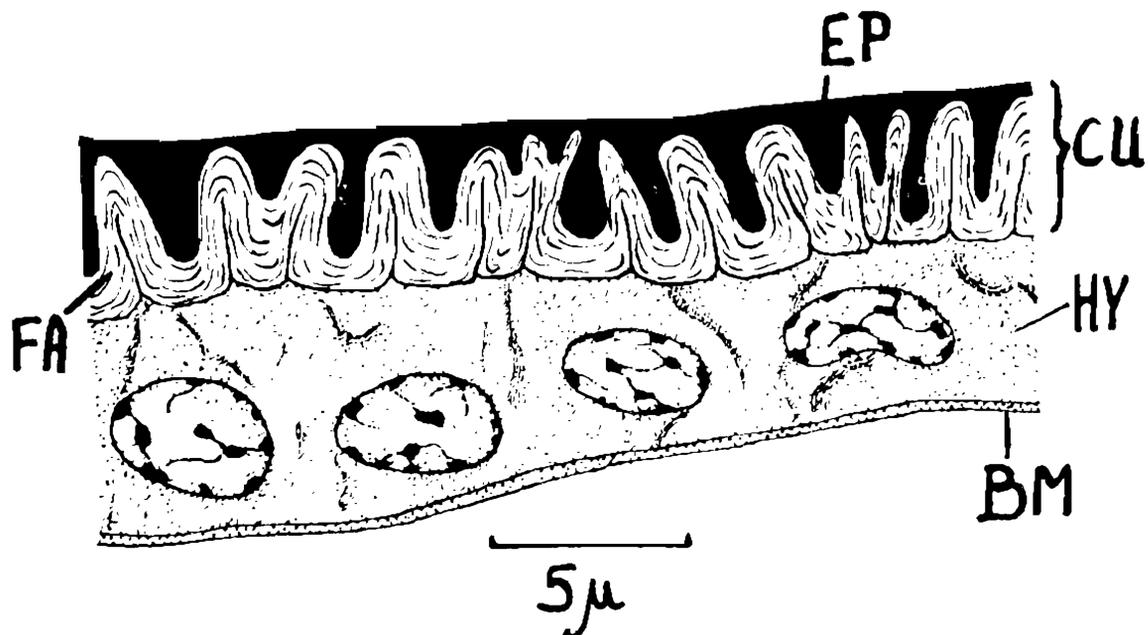


Fig. 3 — Seção da parede elástica na região do aparelho de fechamento. BM — Membrana basal; CU — Cutícula; EP — Epicutícula; FA — Dobras grudadas; HY — Hipoderme.

3/4 da circunferência do canal, ficando o lado dorsal deste liso. Na figura 4 apresentamos a região de transgressão da parte inferior da parede do canal para esta formação especializada. Esta composição dá

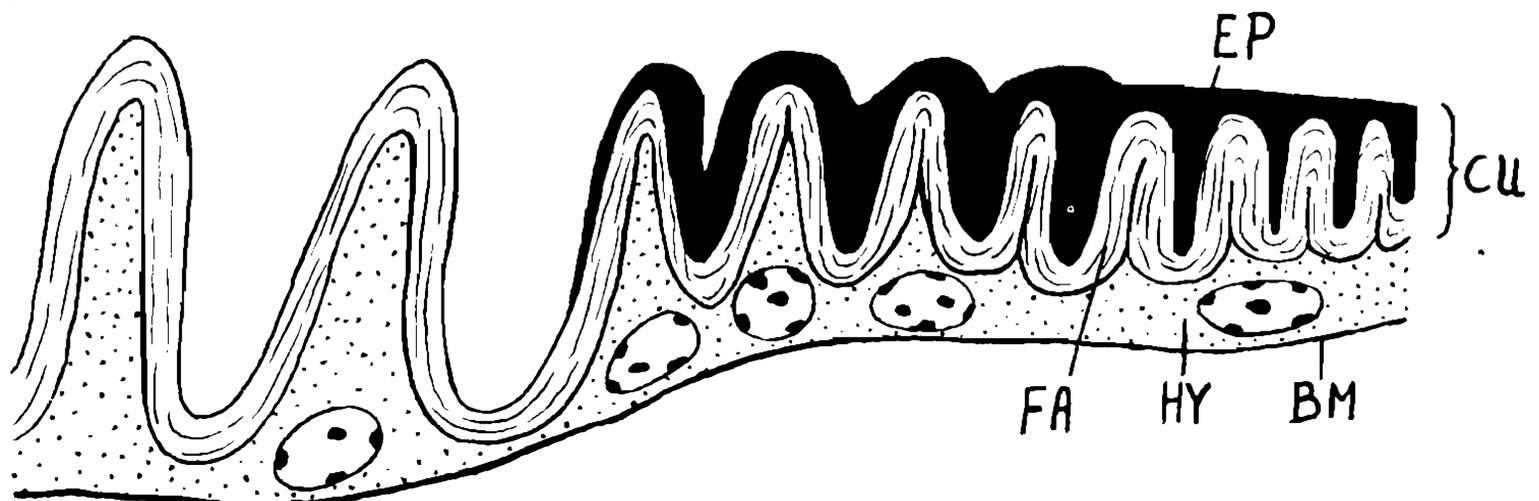


Fig. 4 — Zona entre a parede do canal condutor e a parede do aparelho de fechamento. BM — Membrana basal; CU — Cutícula; EP — Massa epicuticular; FA — Dobras grudadas; HY — Hipoderme.

à parede desta região do canal propriedades altamente elásticas, funcionando como uma mola que força a citada rôlha de fechamento a entrar no lúmen do canal, fechando assim hermêticamente o canal e sua abertura externa. Pela contração do músculo do aparelho de fechamento a mola é deformada e desloca a rôlha parcialmente do interior do canal, de modo que a secreção pode passar através do canal até o orifício externo do sistema. Quando a pressão no interior da cavidade do corpo é grande e provocada, por exemplo, por choque elétrico (usado para extração da peçonha) o líquido pode ser lançado a uma certa distância. A tensão da mola provoca, quando o músculo relaxa, a volta da rôlha para sua posição inicial, fechando novamente o canal.

A expulsão da secreção efetua-se por meio de contração do músculo do aparelho de fechamento e da musculatura inteira do corpo, especialmente dos troncos de músculos longitudinais que reduzem o comprimento do animal, e, com isto, aumentam a pressão no interior da cavidade do corpo. Na ocasião do encurtamento extremo do corpo, a borda posterior de segmento anterior (fig. 5) comprime ainda a vesícula glandular, reforçando o mecanismo de expulsão.

OBSERVAÇÕES HISTOLÓGICAS NAS CÉLULAS GLANDULARES

Como mencionado, o aparelho glandular é de origem ectodérmica, representando uma invaginação complicada do integumento. Este fato aplica-se também ao componente secretor do órgão. As células glandulares compõem a citada vesícula glandular em forma de um epitélio

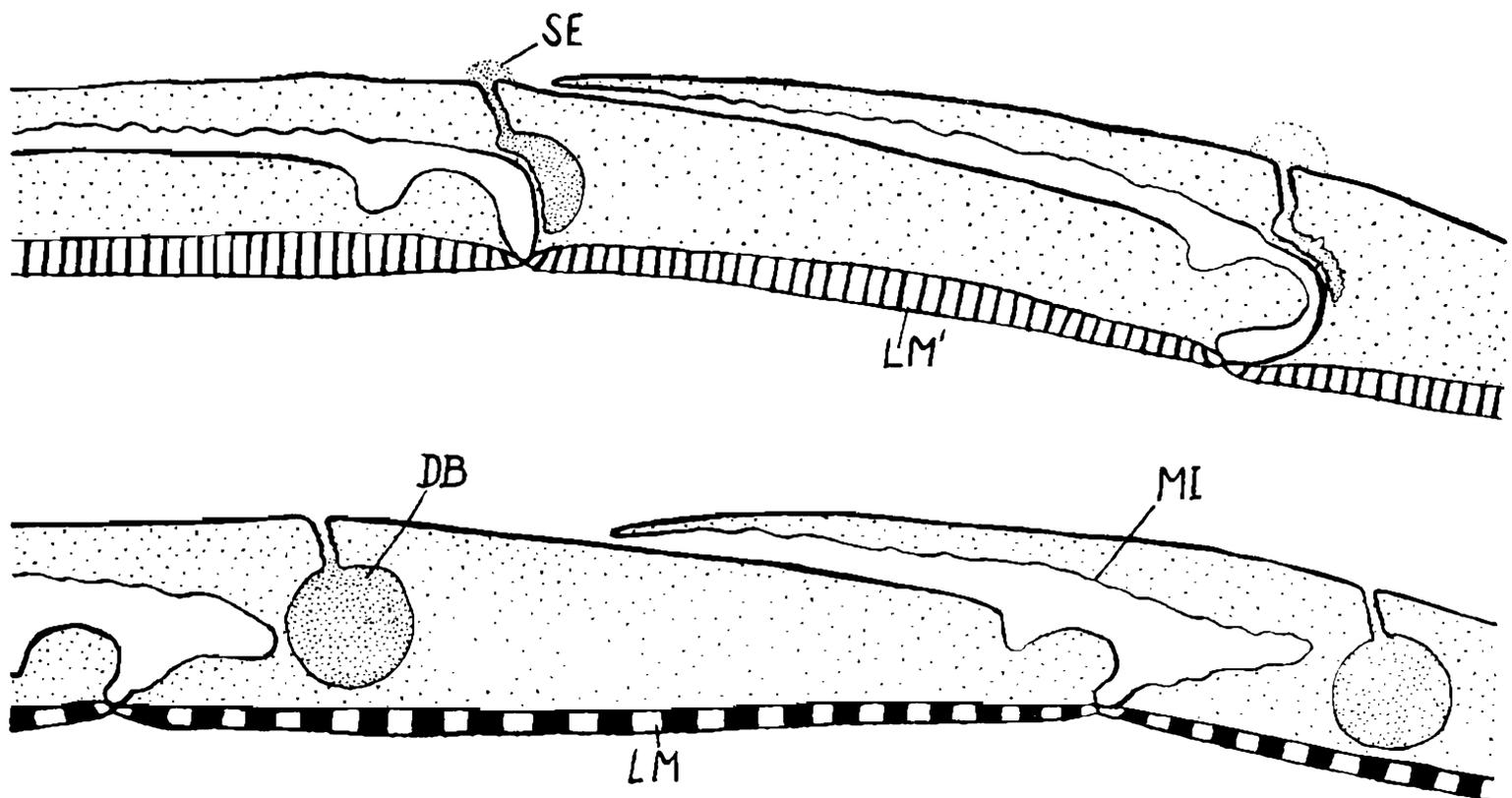


Fig. 5 — Esquema da expulsão da secreção. Em baixo: posição de repouso; em cima: expulsão por contração geral da musculatura do corpo. DB — Vesícula glandular; LM — Músculo longitudinal, relaxado; IM' — em contração; MI — Membrana intersegmental; SE — Secreção expulsa.

simples. As células apóiam-se, na sua base, sobre a membrana basal forte, que atinge $0,6 - 0,7 \mu$ de espessura. Ela contém, isoladamente, núcleos celulares disciformes (figs. 6 e 7). Sua lamela limiar no lado do esquizocélio aparece mais fina do que a lamela do lado oposto. Isto leva a supor que se encontra mais uma membrana, não celular e muito fina, situada entre a membrana forte com núcleos e a face basal das células. Esta suposição é confirmada por nossas observações feitas na hipoderme em animais em fase de muda da cutícula quando, em consequência da proliferação de células hipodérmicas para o interior da

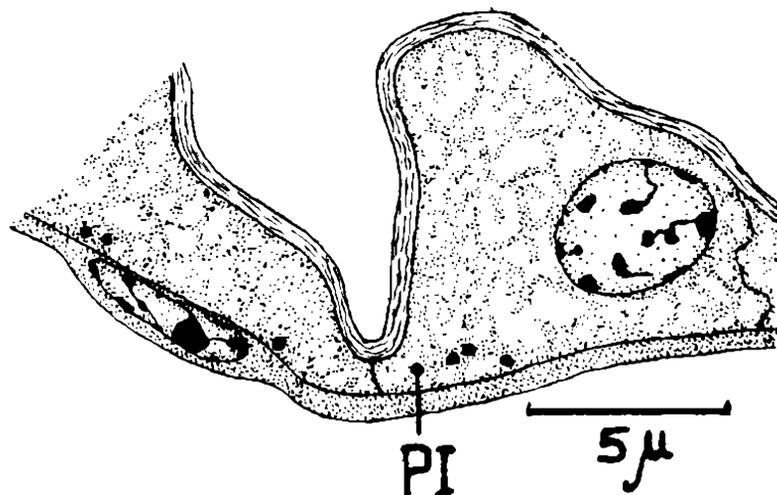


Fig. 6 — Célula glandular do estágio 1; fixação seg. Bouin. PI — Grânulos de pigmento.

cavidade do corpo, se observam duas membranas das quais àquela perto da célula é muito fina enquanto que a outra é espessa e de composição celular. Esta observação podemos interpretar no sentido que a verdadeira membrana basal, que é formada pelas próprias células, é muito fina (aproximadamente $0,1 \mu$), sendo esta secundariamente reforçada por uma outra, mais espessa, composta por células muito achatadas que, em forma de sincício, se apresentam agora como uma membrana uniforme e resistente.

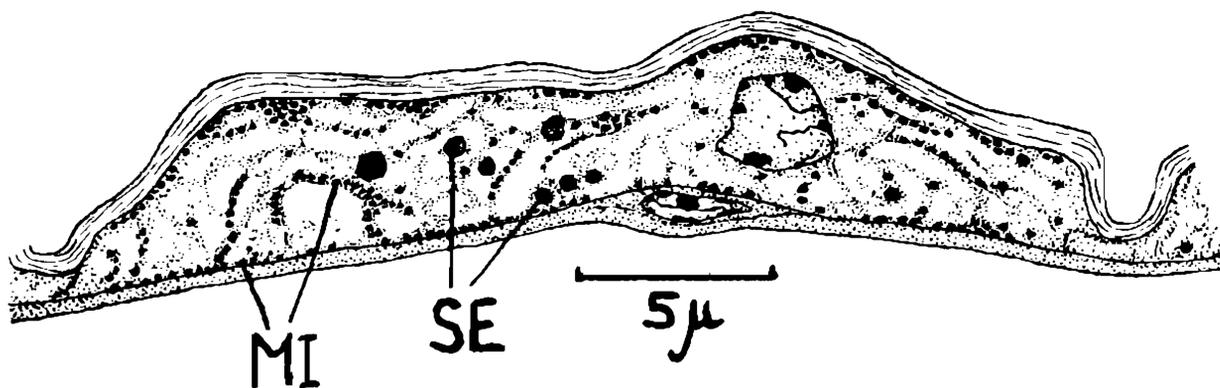


Fig. 7 — Célula glandular do estágio; após tratamento com OsO₄. MI — Mitocôndrios; SE — Gotícula de secreção.

A face apical da célula glandular é revestida por uma lamela cuticular de uma espessura de $0,8 - 0,9 \mu$ (foto 10), que indica a origem ectodérmica das células glandulares. Na fotografia 11, que representa um corte quase tangencial da vesícula glandular, a cutícula foi deslocada, mecânicamente, da face apical das células. Tratando-se a vesí-



FOTO 7



FOTO 8



FOTO 9



FOTO 10



FOTO 11

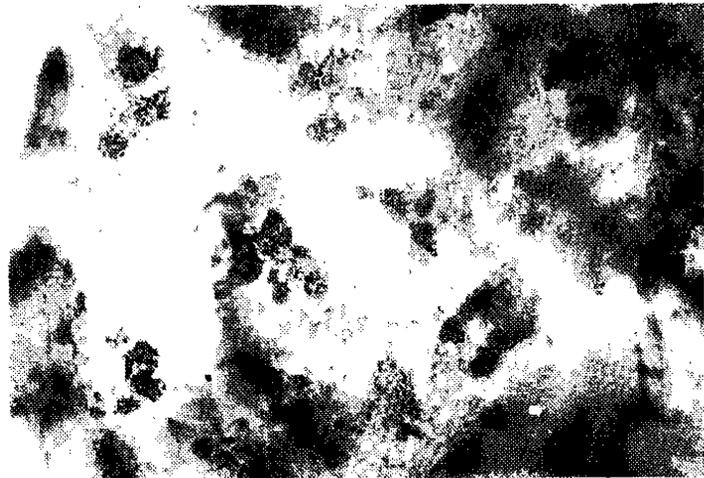


FOTO 12

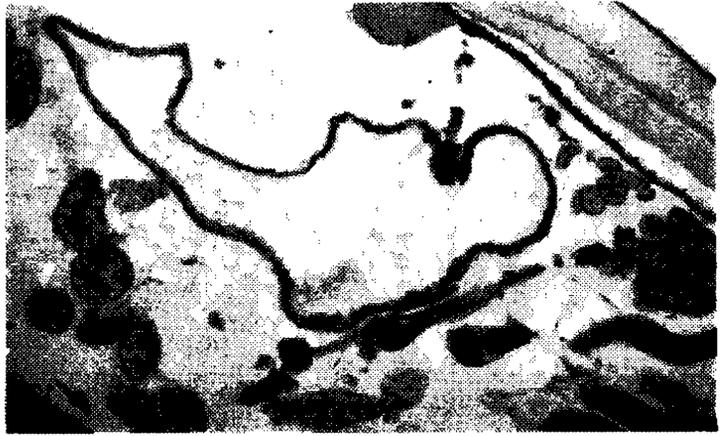


FOTO 13

Foto 7 — Pistão de fechamento do canal condutor da foto 3, aumentado. A cavidade do pistão abriga feixes de tonofibrilas; foto 8 — Corte transversal do canal condutor na altura do dispositivo de fechamento; foto 9 — O corte da foto 8 menos aumentado, para mostrar o músculo do pistão. Em cima, em luz de xenônio; embaixo, em luz polarizada; foto 10 — Parte da parede da vesícula glandular em luz polarizada, para mostrar a lamela cuticular; foto 11 — Corte semi-tangencial da vesícula glandular com células em diferentes estádios de função. A lamela cuticular é parcialmente afastada das células pela cortagem; foto 12 — Preparação total da vesícula glandular, vista de cima. Grupos de células glandulares no quarto estágio de função, cheias de esferas de secreção, entre estes, regiões com células no início da formação de secreção; foto 13 — Corte da vesícula glandular, intercalada entre corpo gorduroso e musculatura; na periferia inferior: feixes de traquéias.

cula com KOH, a lamela pode ser isolada facilmente. A vesícula, em preparação total, mostra células polimorfas, irregulares (fig. 8), possuindo um núcleo ligeiramente oval e poucos grânulos de pigmento em posição periférica, iguais aos encontrados nas células hipodérmicas. O diâmetro médio da célula é 40μ , o dos núcleos $6,5 - 7,5 \mu$. A respeito do conteúdo celular, nota-se, na observação de uma preparação total, diferentes densidades, mesmo em células vizinhas (fig. 8), que

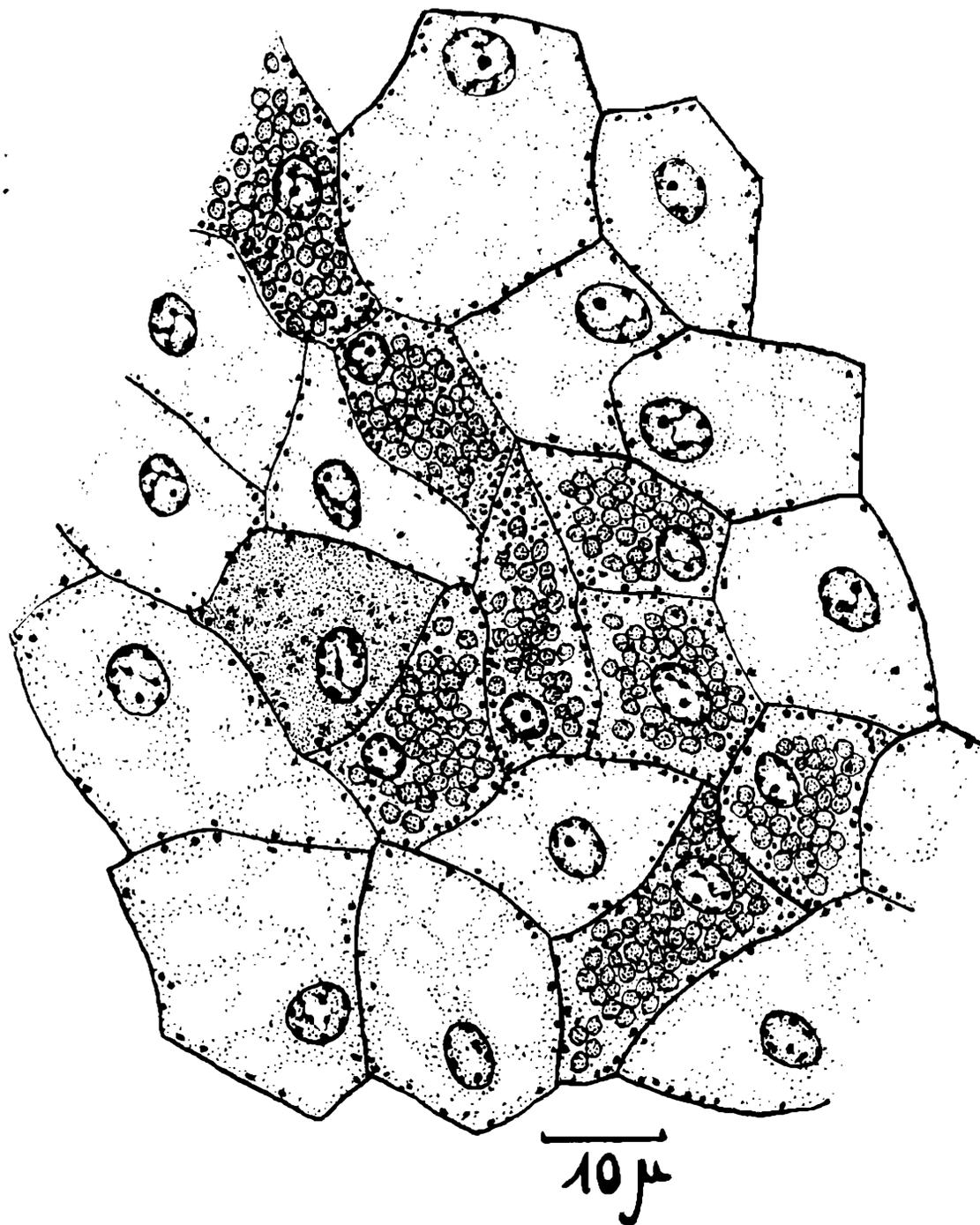


Fig. 8 — Semi-esquema de uma parte da parede da vesícula glandular, visto de cima. Explicações veja no texto.

aparecem em parte vazias, em parte com protoplasma finamente granuloso, ou ainda preenchidas com concretos esféricos, maiores ou menores (fig. 8; foto 12). Trata-se, como será ainda comunicado, de diferentes fases de funcionamento das células glandulares (fig. 1; I — IV):

Fase I: As células deste estágio (fig. 9) correspondem àquelas que, visto de fora, se apresentam quase transparentes com ligeira pig-

mentação. São muito achatadas, com altura de 6-7 μ ; sua lamela cuticular é sempre dobrada e enrugada, em escala variável. Depois de fixação no líquido, segundo Bouin (fig. 6), o protoplasma aparece em forma de filamentos finos, irregulares, sem qualquer inclusões, com excessão de alguns grânulos de pigmento (fig. 6, PI) em posição periférica e basal; por tratamento com ClO_2 , os pigmentos são branqueados. A célula, apresentada na figura 6, é deformada por embebição provocada pelo ácido acético do fixador. Depois de fixação com OsO_4 (fig. 9), o protoplasma oferece um aspecto mais denso, incluindo, porém, alguns pequenos vacúolos. Os limites celulares são nítidos. Encontram-se alguns grânulos de pigmento, na célula da figura 9 branqueados por ClO_2 . Distribuídos, mais ou menos igualmente, sobre toda a face basal, localizam-se numerosos pequenos mitocôndrios esféricos (fig. 9; MI), iguais àqueles que se encontram nos músculos do mesmo corte. Além disto, na altura média da célula, observam-se condensações (fig. 9; VS), não bem limitadas, que se condensam, gradativamente, e que se localizam finalmente nos vacúolos em forma de esferas compactas, muito pequenas (fig. 9; SE). Trata-se, nestas condensações, do início da formação das secreções. Não encontramos, em nossas preparações, células do primeiro estágio sem tais inclusões, de modo que não podemos falar de células em "estado de repouso".

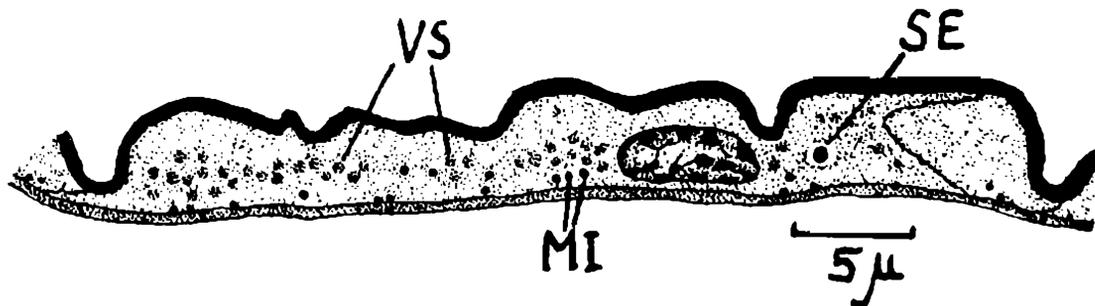


Fig. 9 — Célula glandular do estágio 1, após tratamento com OsO_4 e branqueamento posterior. MI — Mitocôndrios; SE — Gotícula de secreção; VS — Início da formação de secreções.

Fase II: A célula glandular ainda não aumentou em altura; atinge, neste estágio, no máximo 10 μ . Sua cutícula é ainda dobrada, porém menos do que na fase anterior. No protoplasma aparecem cavidades em forma de fendas, formadas por filamentos irregulares, porém nítidos. Não observamos nenhuma substância contida nestes espaços, mesmo após fixação com OsO_4 (fig. 7). O número dos mitocôndrios aumentou sensivelmente; estes localizam-se na face basal da célula bem como nos filamentos e, em parte, na face apical. Os grânulos de pigmento das células da figura 7 foram branqueados por ClO_2 a fim de diferenciá-los dos mitocôndrios. Em algumas regiões da altura média da célula, ocorrem grânulos de secreção maiores (fig. 7; SE), fixados por OsO_4 bem como por todos os outros fixadores (Bouin, Zenker, Carnoy). Nesta particularidade, os grânulos comportam-se do mesmo modo que secreções das glândulas hipodérmicas pluricelulares destes animais, que tomam parte na formação da nova epicutícula no início da muda da cutícula.

Fase III: A célula aumenta muito o seu volume em virtude da elevação do número das cavidades protoplasmáticas, que crescem continuamente, bem como pela formação contínua das secreções. Sua face apical projeta-se, mais e mais, no interior da vesícula (Fig. 10). Os vacúolos com suas gotículas de secreção entram em comunicação entre si, formando algumas cavidades maiores, preenchidas densamente com grânulos de secreção. Não podemos dizer, com certeza, se estas secreções no interior da célula se apresentam como grânulos solidificados ou como gotículas. Depois da fixação, a secreção intracelular é, sem dúvida, solidificada; na célula supravital, as esferas se mantêm íntegras, mesmo destruindo a célula com micro-agulhas. Conclui-se que o produto glandular intracelular tem uma consistência semi-sólida ou sólida, porque não se dissolve no líquido isotônico. Chamamos a atenção para o fato que seu comportamento é diferente do da secreção definitiva, contida no interior da vesícula; êste se dissolve facilmente em qualquer líquido e não é fixado pelos fixadores usados neste trabalho. Sendo assim, as duas substâncias diferem-se entre si por propriedades físicas, talvez também pela sua composição química. Esta diferença dá-nos o direito de considerar o produto glandular intracelular como pré-secreção, diferenciando-se nitidamente da secreção definitiva.

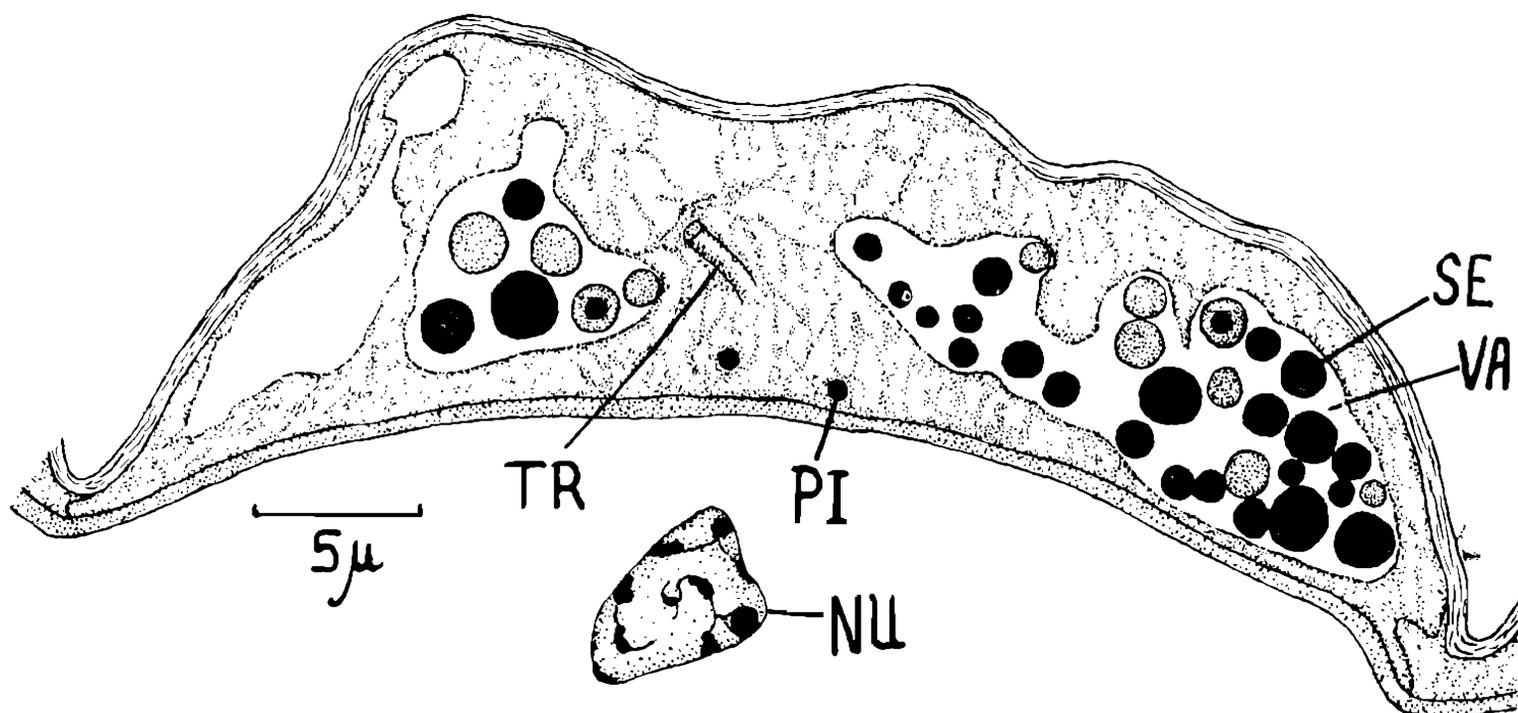


Fig. 10 — Célula glandular do estágio 3, fixação seg. Bouin. Embaixo: seu núcleo (NU) do corte seguinte da mesma série de cortes. PI — Grânulos de pigmento; SE — Esferas de secreção; TR — Traquéia intracelular; VA — Vacúolo.

Na figura 10, apresentamos uma célula em corte sagito-lateral; o núcleo desta célula foi desenhado do corte seguinte na série (NU). Nesta célula, fixada no líquido, segundo Bouin, e que é ligeiramente embebida, observamos alguns grânulos de pigmento (PI). Também aparece no interior da célula a parte da porção terminal de uma traquéola (TR), fato êste que indica o grande consumo de O_2 pela célula,

e que ainda é provado pela concentração acentuada de traquéias e feixes de traquéias perto da superfície externa da vesícula (foto 13). Temos que mencionar que já foram encontradas terminações intracelulares de traquéias ou traquéolas em células glandulares, altamente ativas, de Artrópodes (BARTH (1954).

A pré-secreção no interior da célula mostra diferentes reações aos vários fixadores. Não se dissolve, mas coagula em todos os fixadores histológicos usados. Em líquidos, contendo sublimado ou OsO_4 , a pré-secreção solidifica-se densamente e não altera sua cor, que fica marrom-clara como em células supravitais; com hematoxilina férrica corase uniformemente em preto (figs. 7 e 12). Depois da fixação, segundo Bouin e coloração com hematoxilina férrica, os grânulos mostram variações da tonalidade (figs. 10 e 11). Na figura 11 apresentamos, na mesma escala, várias inclusões de uma célula glandular da fase III (fixação segundo Bouin): a) um grupo de mitocôndrios; b) um grânulo de pigmento e c) um grupo de esferas de pré-secreção em diferentes estádios de condensação. Observa-se que a condensação se inicia no centro da esfera e, progredindo em sentido centrífugo, finalmente se estende sobre todo o grânulo. Uma modificação muito semelhante ao fato descrito encontramos no interior de grânulos de secreção em células da parte lipócrina da glândula salivar de *Aedes scapularis* BARTH (1956). Os grânulos deste Díptero são lipóides ou contêm uma alta porcentagem em substâncias lipóides e podem ser fixados apenas por líquidos contendo OsO_4 . Em nosso Diplópode, a pré-secreção não possui componentes gordurosos e pode ser fixada por todos os fixadores.

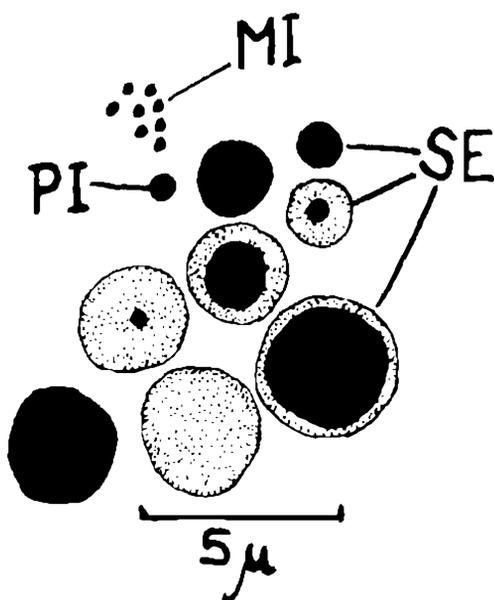


Fig. 11 — Algumas inclusões na célula do estágio 3, após tratamento com OsO_4 , sem branqueamento. MI — Mitocôndrios; PI — Grânulos de pigmento; SE — Esferas de secreção em diferentes fases de condensação.

Fase IV: A célula é mais volumosa pelo fato que o número das esferas aumentou e, conseqüentemente, a cavidade intracelular cresceu. Esta foi formada por fusão das grandes cavidades em forma de fenda no protoplasma do estágio anterior. Agora a célula da Fase IV possui apenas um corpo protoplasmático central, mais ou menos vo-

lucoso, contendo o núcleo, e um revestimento protoplasmático nas paredes, mostrando uma espessura variável. Em cortes não tratados com diafanol (fig. 12) aparecem algumas partículas de pigmento. Os mitocôndrios, que se localizam durante a Fase I na parte basal da célula e nas Fases II e III espalhados sobre toda a célula, acumulam-se durante a Fase IV em número muito elevado imediatamente embaixo da face apical, enquanto que na região basal e nas outras partes do corpo protoplasmático se encontram apenas poucos. Estas observações indicam que, citologicamente, a atividade secretorial da célula é distribuída em três zonas: na primeira fase o auge da função deve ser procurado na parte basal da célula, nas fases II e III no corpo protoplasmático inteiro e na última fase na zona apical. Citologicamente não podemos observar uma relação entre a concentração dos mitocôndrios na zona apical da célula da quarta fase e a expulsão das secreções que ocorre no fim deste estágio. A passagem das secreções através da membrana cuticular consideramos como um processo "micro-apócrino".

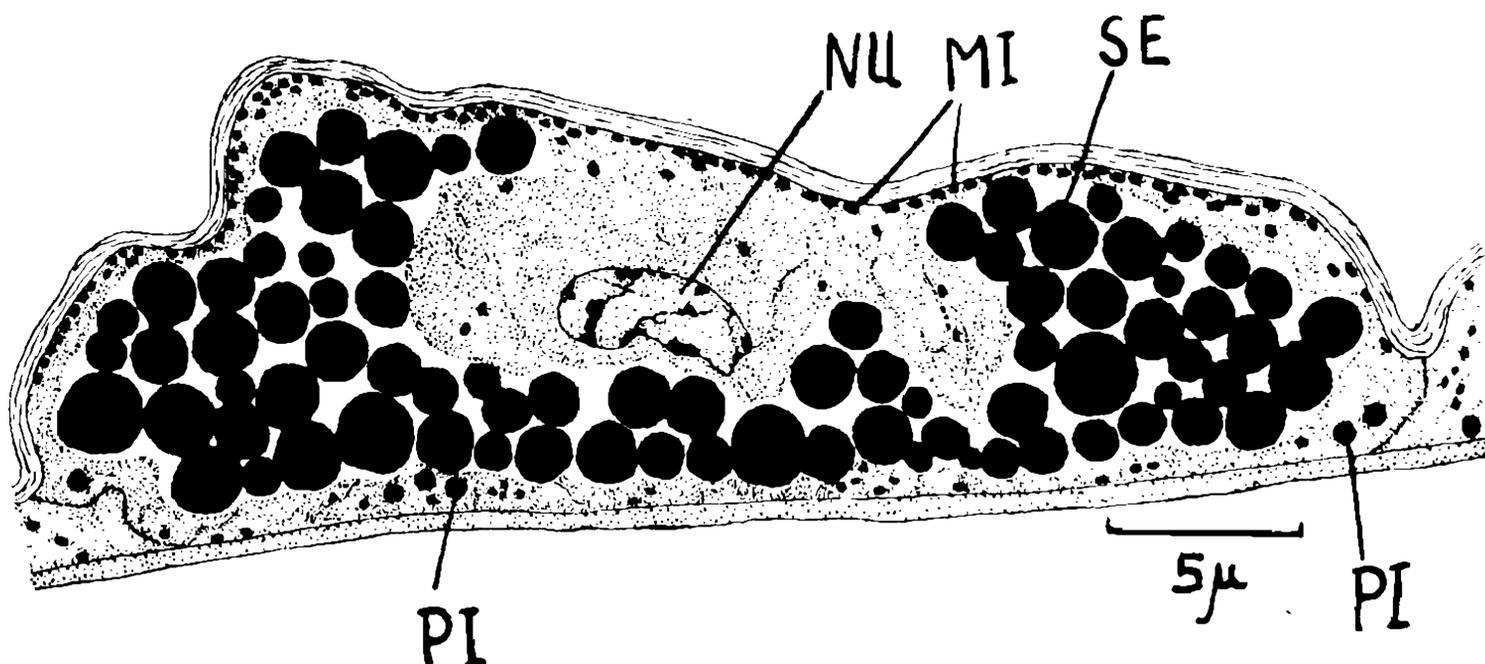


Fig. 12 — Célula glandular do estágio 4, após tratamento com OsO_4 , sem diafanol. MI — Mitocôndrios; NU — Núcleo; PI — Grânulos de pigmento; SE — Esferas de secreção dentro do único vacúolo.

A secreção no interior da vesícula glandular não pode ser precipitada com qualquer dos fixadores aplicados. Apenas depois tratamento com OsO_4 constatamos a presença de um sistema delicado e não contínuo de filamentos finos e irregulares, como indicado no esquema da figura 13d. Além disto, encontram-se acima das células do último estágio, alguns concretos, de forma irregular, frequentemente semi-lunares, que, após branqueamento por H_2O_2 , se coram em marrom por hematoxilina férrica. Estes corpúsculos não ocorrem na parte central da vesícula.

Pelo fato que a secreção dentro da célula pode ser facilmente fixada, fora da célula porém não, podemos concluir que a secreção sofre uma alteração química imediatamente antes ou durante a passagem através da cutícula, processo este provavelmente influenciado pela ação

enzimática dos mitocôndrios acumulados na parte apical da célula. Este problema pode ser solucionado apenas por estudos bioquímicos.

Na figura 13 apresentamos, esquematicamente, os quatro estádios de função das células glandulares.

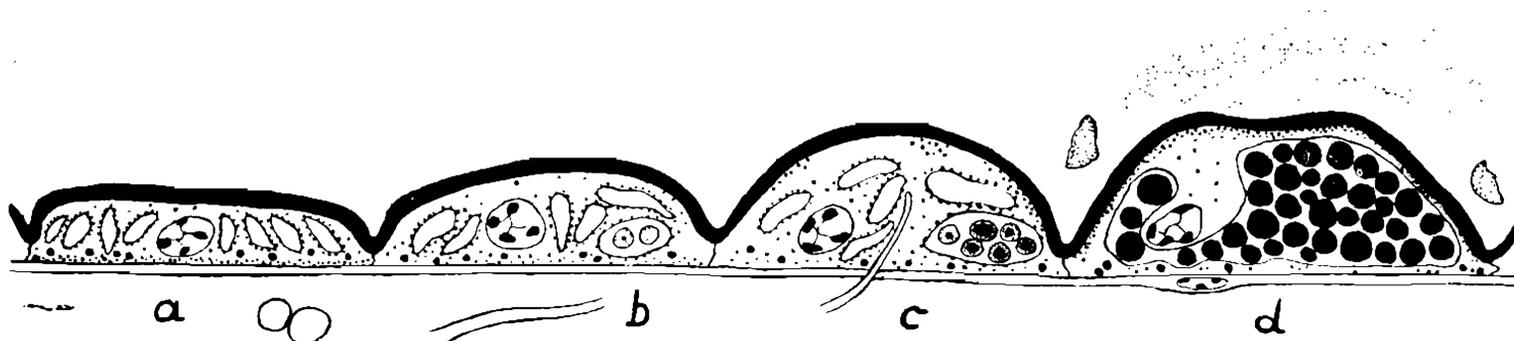


Fig. 13 — Esquema dos quatro diferentes estádios de função da célula glandular: a) primeiro; b) segundo; c) terceiro e d) quarto estágio.

RESUMO

No presente trabalho, descreve-se a estrutura microanatômica e citológica, bem como a função das glândulas laterais de um Diplópode, *Rhinocricus padbergii*. Chegamos aos seguintes resultados principais:

1 — Do ponto de vista anatômico, o aparelho glandular representa uma invaginação complicada do integumento. O epitélio glandular é uma formação homóloga à hipoderme, fato provado pela presença de um revestimento cuticular e de pigmentos nas células de todo o aparelho. O sistema compõe-se de uma vesícula glandular, de um canal condutor e de um dispositivo de fechamento.

2 — Os detalhes da construção do aparelho glandular inteiro apresentamos na figura 1. Todo o complexo possui apenas um forte músculo para o movimento do aparelho de fechamento; seu antagonista é uma região elástica do próprio aparelho de fechamento que funciona à maneira de mola em virtude de numerosas dobras grudadas.

3 — A hipoderme glandular possui uma membrana basal muito fina, sendo porém reforçada, secundariamente, por uma membrana celular mais forte.

4 — A expulsão de secreção através da abertura externa (“poro glandular”) dá-se por meio de aumento da pressão no interior da cavidade geral do corpo (contrações generalizadas da musculatura inteira do corpo) e pela pressão da borda posterior do segmento anterior, exercida sobre a vesícula glandular devido à contração dos troncos da musculatura longitudinal.

5 — A respeito da função das células glandulares diferenciamos quatro estádios:

a) Fase I: Na zona média da célula formam-se concentrações de secreção difusas. Os mitocôndrios localizam-se, quase exclusivamente, sobre a face basal da célula.

b) Fase II: As concentrações de secreção difusas tornam-se mais densas; as esferas de secreção aumentam, gradativamente, de diâme-

tro e localizam-se em vacúolos, em forma de fendas, no protoplasma. Os mitocôndrios aumentam de número, distribuindo-se sobre todo o interior da célula.

c) Fase III: Os vacúolos pequenos confluem em alguns grandes, preenchendo-se com esferas de secreção, maiores e menores. Os mitocôndrios deslocam-se em direção à zona apical da célula, encontram-se porém, ainda, também em número elevado no protoplasma.

d) Fase IV: Os vacúolos juntam-se, formando um só vacúolo grande que ocupa mais do que a metade do volume da célula e que é preenchida por esferas de secreção. Os mitocôndrios encontram-se agora quase exclusivamente na face apical da célula.

6 — Durante a formação das esferas de secreção ocorre no seu interior uma condensação secundária, que se inicia no centro de cada esfera, e que pode ser comparada com o mesmo fato observado nas esferas de secreção das células lipócrinas das glândulas salivares de *Aedes scapularis*.

7 — A secreção não é de natureza lipóide.

8 — A expulsão da secreção da célula é um processo micro-apócrino.

9 — As esferas de secreção no interior da célula e a secreção contida na vesícula glandular têm uma composição química diferente. Baseando-se na migração dos mitocôndrios (veja os itens 5 a-d deste resumo) conclui-se que, antes ou durante sua passagem através da face apical da célula, a secreção sofre uma modificação química por ação enzimática.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden in dieser Arbeit die mikroanatomische und cytologische Struktur, sowie die Funktion der Seitendrüsen eines Tausendfüßlers, *Rhinocricus padbergii*, beschrieben. Es ergaben sich folgende Hauptergebnisse:

1: Anatomisch gesehen ist der Drüsenapparat eine komplizierte Invagination des Integuments, so dass das Drüsenepithel der Hypodermis homolog ist, was durch die Existenz einer Cuticularbedeckung und von Pigmentkoernern bestäetigt wird. Er besteht aus einer Drüsenblase, dem Ausführgang und dem Verschlussapparat.

2: Einzelheiten des Aufbaus des Drüsenapparates ergeben sich aus dem Schema der Figur 1. Der gesamte Komplex besitzt nur einen kraeftigen Muskel, der den Verschlussapparat oeffnet; sein Antagonist ist eine durch verkittete Falten elastische Region des Ausführganges, die wie eine Blattfeder wirkt.

3: Die Drüsenhypodermis besitzt eine sehr duenne Basalmembran, die durch eine sekundaer aufgelagerte, zellige, dickere Membran verstaerkt wird.

4: Die Austreibung des Sekrets aus der aeusseren Muendung des Apparates (Druesenporus) erfolgt durch Druckerhoehung in der Leibeshoehle (allgemeine Kontraktion der gesamten Skelettmuskeln) und durch Druck des Hinterrandes des vorhergehenden Segments auf die Druesenblase infolge Kontraktion der Laengsmuskelstaemme.

5: An den Druesenzellen lassen sich vier Funktionsstadien unterscheiden:

a) 1. Stadium: In der mittleren Zellzone bilden sich diffuse Sekretkonzentrationen. Die Mitochondrien befinden sich fast ausschliesslich auf der Basalflaeche der Zelle.

b) 2. Stadium: Die diffusen Sekretkonzentrationen werden dichter, nehmen laufend an Groesse zu und liegen in vakuolenaehnlichen Spaltraeumen des Protoplasmas. Die Mitochondrien nehmen an Zahl zu und verteilen sich ueber den gesamten Zellraum.

c) 3. Stadium: Die kleinen Spaltraeume fliessen zu einigen groesseren zusammen, die sich mit groesseren und kleineren Sekretkugeln fuellen. Die Mitochondrien wandern zur apikalen Zellflaeche, finden sich aber auch in groesserer Anzahl im Protoplasma.

d) 4. Stadium: Die Vakuolen vereinigen sich zu einer einzigen grossen, die ueber die Haelfte des Volumens der Zelle einnimmt. Sie ist dicht mit Sekretkugeln gefuellt. Die Mitochondrien finden sich jetzt fast ausschliesslich an der apikalen Zellflaeche.

6: Waehrend der Bildung der Sekretkugeln erfolgt in diesen eine sekundaere Kondensation, die im Zentrum beginnt, vergleichbar mit dem gleichen Vorgang in den Sekretkugeln der lipokrinen Zellen der Speicheldruese von *Aedes scapularis*.

7: Das Sekret ist nicht lipoider Natur.

8: Der Ausstoss des Sekrets aus der Zelle ist micro-apokrin.

9: Die Sekretkugeln in den Zellen und das Sekret in der Druesenblase haben unterschiedliche chemische Zusammensetzung. Aus der Wanderung der Mitochondrien (siehe Punkt 5 a-d dieser Zusammenfassung) wird geschlossen, dass vor oder waehrend seines Durchtritts durch die apikale Zellflaeche das Sekret auf enzymatischem Wege chemisch veraendert wird.

BIBLIOGRAFIA

- ATTENS, C. GRAF, 1930, *Myriapoda* em: Kueckenthal, W., *Handbuch der Zoologie*. Vol. 4, 1. Haelfte.
- BARTH, R., 1954, Estudos anatômicos e histológicos sôbre a sub-família *Triatominae* (*Heteroptera, Reduviidae*). IV. parte: O complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 52 : 517-585, 54 figs.
- BARTH, R., 1956, O complexo das glândulas salivares de *Aedes scapularis* (*Diptera*). *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 28 : 231-242, 20 figs.
- BURMEISTER, H., 1834, *Die Respirationsorgane von Julus und Lepisma*. *Isis*, Jahrg. 1834, pg. 134.

- EISNER, T., J. J. HURST AND J. MEINWALD, 1963a, Defense mechanism of Arthropods XI. The structure, function, and phenolic secretions of the glands of a Chordeumoid Millipede and a Caraboid beetle. *Psyche*, 70 : 94-116, 3 figs., 13 fotos, 1 tab.
- EISNER, T., H. E. EISNER, J. J. HURST, F. C. KAFATOS, J. MEINWALD, 1963b, Cyanogenic glandular apparatus of a Millipede. *Science*, March 22, vol. 139, n.º 3560 : 1218-1220, 5 figs.
- HEATHCOTE, 1888, Em: *Phil. Trans. Roy. Soc.* XLIII. (seg. cit. Attens).
- LEYDIG, F., 1857, Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere. Frankfurt, pg. 116.
- ROSSI, G., 1903, Le glandule odorifere dell' *Julus communis*. *Zeitschr. wiss. Zool.*, 74 : 64-80, 1 Tafel.
- SAVI, P., 1828, Sopra una specie d'*Julus communissima*. Em: *Mem. scientifiche. Decade prima*. Pisa, pg. 63.
- SILVESTRI, H., 1902, Note preliminari sulla morfologia dei Diplopodi e Chilopodi. *Rivista di Patol. veget.* Vol. X, pg. 414.
- TREVIRANUS, R., 1817, *Vermischte Schriften anatomischen und physiologischen Inhalts*. Bremen. Vol. II, pg. 39.
- VOGES, E., 1878, Beitrag zur Kenntnis der Juliden. *Zeitschr. wiss. Zool.*, 31 145-146, 3 figs.
- WEBER, M., 1882, Ueber eine Cyanwasserstoffsaeure bereitende Druese. *Arch. f. mikr. Anat.*, 21 : 468-475, 1 Tafel.