

CRISTINA LÚCIA SANT'ANA COSTA AYUB

**ESTUDO DA ESPERMATOGÊNESE E DA MORFOLOGIA DOS
ESPERMATOZÓIDES DA ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão
(1934) (ARANEAE: SICARIIDAE), ANTES E APÓS A TRANSFERÊNCIA PARA O
CORPO DA FÊMEA**

**CURITIBA
2006**

CRISTINA LÚCIA SANT'ANA COSTA AYUB

**ESTUDO DA ESPERMATOGÊNESE E DA MORFOLOGIA DOS
ESPERMATOZÓIDES DA ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão
(1934) (ARANEAE: SICARIIDAE), ANTES E APÓS A TRANSFERÊNCIA PARA O
CORPO DA FÊMEA**

**Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.**

Orientação: Prof.^a Dr.^a Cloris Ditzel Faraco

**CURITIBA
2006**

Dedico esta tese

Ao meu esposo Ricardo Antonio Ayub, aos meus filhos Laís e Bruno, e aos meus pais Paulo Melgaço de Assunção Costa (*in memoriam*) e Lúcia Maria Sant'Ana Costa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Paulo (*in memoriam*) e à minha mãe Lúcia pelas oportunidades que me ofereceram, e pelos exemplos de ética, justiça, e honestidade que me deram;

À minha família, Ricardo meu esposo, Laís e Bruno meus filhos, pelo incentivo e pela imensa compreensão com minha ausência em muitos momentos; ao Ricardo em especial por ter sido pai e mãe dos nossos filhos nos momentos em que eu não estive presente, e também pelo apoio que me deu nos momentos difíceis;

Ao DEBIOGEM/UEPG pela confiança e incentivo; aos meus colegas de área, Zezinho, Tina e Ana Carolina, por toda força que me deram; à amiga e colega Sônia, pela força e companheirismo; à técnica Mari, e às estagiárias, Mônica (em especial), Aline e Renata, pela colaboração neste trabalho;

À PROPESP/UEPG pela oportunidade de obter a bolsa e pelo acompanhamento constante;

Às minhas colegas, amigas e companheiras do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Cláudia, Patrícia, Marisa, e Carol pelo companheirismo e ajuda;

Às estagiárias do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Mônica e Arleide, pelo auxílio no início do projeto; às demais colegas do laboratório, Fabiana, Renata, e Simone, pelo apoio;

A todos os colegas do Programa, pela convivência;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, à Coordenadora Prof.^a Dr.^a Célia Regina, e à Secretária Marlene;

À coordenação do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, e em especial às funcionárias, Rosângela, Regina e Matilde, pelo apoio na realização deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular, Gerizalda, Ana, Nino, Eliana, e Rosalina;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR, pelos ensinamentos e apoio;

Aos demais professores do Departamento de Biologia Celular, Cláudia, Cláudio, Zão, Maria Helena, Marco, Carla, Cecília, Lucélia, Flávia, e Sônia, pelos aconselhamentos e convivência;

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Prof.^a Cloris, mais que a minha orientadora do doutorado, uma amiga, pelos exemplos de ética, humildade, pelos conhecimentos compartilhados, e pela constante presença;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. A ARANHA MARROM <i>Loxosceles intermedia</i>	1
1.2. DADOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS	2
1.3. A ARANHA MARROM <i>Loxosceles intermédia</i> E LOXOSCELISMO	4
1.4. O ESPERMATOZÓIDE E O PROBLEMA DA REPRODUÇÃO	5
1.5. OBJETIVOS	7
1.6. REFERÊNCIAS	8
CAPÍTULO 2 – EVALUATION OF FIXATIVE SOLUTIONS...	
ABSTRACT	13
RESUMO	14
1. INTRODUCTION	15
2. MATERIAL AND METHODS	15
2.1 ANIMALS	15
2.2 FIXATIVE SOLUTIONS	16
2.4 DISSECTION, FIXATION, AND EMBEDDING METHOD	16
2.5 SECTIONING, STAINING AND ANALYSIS	17
3. RESULTS	17
4. DISCUSSION	19
ACKNOWLEDGMENTS	21
REFERENCES	21
CAPÍTULO 3 – ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF...	
ABSTRACT	31
1. INTRODUCTION	32

2. MATERIAL AND METHODS	33
2.1 LIGHT MICROSCOPY	33
2.2 ELECTRON MICROSCOPY	34
2.2.1 TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY	34
2.2.2 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	34
3. RESULTS	34
3.1 MALE REPRODUCTIVE TRACT	34
3.1.1 GROSS ANATOMY	35
3.1.2 TESTIS HISTOLOGY	35
3.2 SPERMIOGENESIS	35
3.3 SYNSPERMIA	37
4. DISCUSSION	39
ACKNOWLEDGMENTS	43
REFERENCES	44
 CAPÍTULO 4 – THE FEMALE GENITALIA...	
ABSTRACT	60
1. INTRODUCTION	62
2. MATERIAL AND METHODS	63
2.1 ANIMALS	63
2.2 COPULATIONS	64
2.3 LIGHT MICROSCOPY	64
2.4 ELECTRON MICROSCOPY	64
2.4.1 TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY	65
2.4.2 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	65
3. RESULTS	65
3.1 THE SYNSPERMIA TRAJECTORY	65
3.2 <i>L. intermedia</i> GENITAL APPARATUS	66
3.3 SPERMATHECA MORPHOLOGY	66
3.4 THE VIRGIN FEMELE SPERMATHECAE	67
3.5 THE SPERMATOOZA TRANSFER	67
3.6 ADULT FEMALES AT OVIPOSITION	68

3.7 FEMALES WHICH HAD LAID EGGS TWO OR THREE MONTHS BEFORE ...	68
4. DISCUSSION	68
ACKNOWLEDGMENTS	72
REFERENCES	73
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	
CONCLUSÕES	93
PERSPECTIVAS	96

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figures 1 - 4. Transmission electron micrographs showing brown spider testes fixed with FS 1 (Fig. 1), FS 2 (Fig. 2), FS 4 (Fig. 3), FS 5 (Fig. 4).....	26
Figures 5 - 7. Transmission electron micrographs showing details of cells treated with FS 2, 4, and 5.....	28

CAPÍTULO 3

Figure 1.	47
(a) Schematic representation of a ventral portion of a male <i>Loxosceles intermedia</i> ...	
(b) Brown spider testicle in cross section, H&E...	
(c) H&E. staining, second meiosis division...	
(d) Early spermatids connected by a cytoplasmic bridge...	
(e) Mid spermatid; posterior region ...	
(f) Cross section of mid-to-late spermatid nucleus...	
(g) Late spermatid in longitudinal section...	
Figure 2.	49
(a) Early spermatid...	
(b) Mid-to-late spermatid...	
(c) Late spermatids with condensed chromatin...	
(d) Flagellum in cross section...	
(e) Posterior region of spermatid with the implantation fossa...	
(f) Mid spermatid with the flagellar basal body, in longitudinal section...	
Figure 3.	51
(a) Three spermatids connected by cytoplasmic bridges...	
(b) A group of spermatids during spermiogenesis...	
(c) Synspermium containing late spermatids...	
(d) Detail of the synspermium shown in Fig. 3c...	
(e) Mature synspermium with the partially individualized sperm cells...	
(f) Mature synspermium containing 4 sperm cells...	

Figure 4.	53
Schematics representing the model proposed for the arrangement of the synspermium in <i>L. intermedia</i> ...	
Figure 5.	55
(a) Merged photomicrograph of spermatids submitted to TRITC-phalloidin treatment and DAPI staining...	
(b) Central portion of <i>L. intermedia</i> testis in cross section, PAS reaction...	
(c) Vas deferens in cross section, PAS reaction...	
Figure 6.	57
(a) Scanning electronmicrograph showing an almost mature synspermium, still inside the testis...	
(b) Scanning electronmicrograph showing a vas deferens in cross section...	
(c) Transmission electronmicrograph showing mature synspermia inside the proximal vas deferens...	
(d) Transmission electronmicrograph showing mature synspermia inside the distal vas deferens...	
CAPÍTULO 4	
Figure 1.	77
A. Ventral view of a female <i>L. intermedia</i> abdomen...	
B. Simple type palp of male <i>L. intermedia</i> ...	
Figure 2.	79
Transmission electron microscopy, showing the synspermium/synspermia inside the testicle (A), and at the proximal (B) and final vasa (C); and light microscopy of the synspermia reaching the common ejaculatory channel (D)...	
Figure 3.	81
<i>L. intermedia</i> simple bulb (in A) and the synspermia and secretion (in B) showed by scanning electron microscopy. Longitudinal (in C) and cross (in D) sections of the bulb, light microscopy, HE staining...	
Figure 4.	83
A. Representation of the ventral surface of a female <i>L. intermedia</i> abdomen...	
B. Longitudinal section through the genital opening region of a female abdomen...	

C. Schematic representation of the longitudinal section of the female abdomen showed in Fig. 4B...	
D. The spermathecal stalk of an adult female in cross section...	
Figure 5.	85
Secretion inside the spermatheca of the virgin spider, which reacted positively to PAS (in A) and nynhidrin-Schiff (in B)...	
Figure 6.	87
Spermatheca of a recent coupled female, cross sections; PAS (in A) and nynhidrin-Schiff (in B)...	
Figure 7.	89
A. cross section of the distal stalk portion of the spermatheca containing still encapsulated sperm cells...	
B. longitudinal section of the proximal portion of the spermatheca, containing free sperm cells surrounded by the uterus secretion...	
C – F. different situations in which the free sperm cells were founded	
Figure 8.	91
Spermatheca of the female that had laid eggs two or three months before, PAS (in A) and nynhidrin-Schiff (in B)...	

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 – COMPOSITION AND OSMOLALITY OF BUFFERS AND FIXATIVE SOLUTIONS	23
TABLE 2 – GENERAL ASPECT OF BROWN SPIDER TESTES FIXED WITH THE FIVE SOLUTIONS TESTED	24

RESUMO

A aranha marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão 1934 (Araneae, Sicariidae) é uma espécie venenosa amplamente distribuída na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Sua peçonha, de ação proteolítica, causa necrose local podendo se estender ao nível sistêmico e levar sua vítima à morte. Descrições foram realizadas sobre o comportamento reprodutivo e também a respeito da ovogênese para esta espécie de aranha, porém os aspectos relativos à espermatogênese, à transferência dos espermatozóides para o corpo da fêmea, e às condições de estocagem dos espermatozóides no interior das espermatecas, ainda não foram investigados. O presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo de fixação para os tecidos da aranha marrom, a análise ultraestrutural dos aspectos envolvidos na espermiogênese, e a descrição da morfologia das espermatecas em microscopia de luz e as condições de estocagem dos espermatozóides no interior das espermatecas. A partir das experimentações realizadas, conclui-se que: 1) a fórmula fixativa mais adequada para os tecidos de aranha foi: glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2%, em tampão cacodilato de sódio a 200mM; 2) a estrutura geral do aparelho reprodutor feminino e masculino da aranha marrom segue o padrão normal descrito para aranhas haplóginas, com algumas variações para esta espécie; 3) o espermatozóide da aranha possui características consideradas plesiomórficas para aranhas: um capuz acrosomal alongado e uma elongação pós-centriolar curta; 4) a forma de transferência dos espermatozóides é o *synspermium*, contendo 4 espermatozóides encapsulados, ainda na forma sincicial, compartilhando um citoplasma e membrana plasmática comuns; 5) as espermatecas são do tipo fundo-de-saco, com epitélio pseudoestratificado composto por unidades glandulares produtoras de uma secreção glicoproteica; 6) as fêmeas que colocaram ovos meses antes e aquelas coletadas no momento da oviposição continham espermatozóides livres nos ductos espermatecais. O presente trabalho constitui uma pequena contribuição para o debate das questões controversas relacionados aos aspectos morfológicos do aparelho reprodutor das aranhas para o esclarecimento de aspectos evolutivos e filogenéticos em Araneae.

ABSTRACT

The brown spider *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae, Sicariidae) is a venomous species widely distributed in Curitiba, Paraná. Its venom has a proteolytic effect, causing local necrosis and even death after reaching systemic level. The reproductive behavior and oogenesis of this species has been described, but there is no report of aspects of spermatogenesis, sperm transfer and storage in the female body. This work analysed fixation protocols for *Loxosceles* tissues, the ultrastructural aspects of spermiogenesis, the morphology of spermathecae at light microscopy level and the storage conditions of sperm cells. The results show that: 1) the more efficient fixation was obtained with the formula: 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 200mM sodium cacodylate buffer; 2) the morphology of the female and male reproductive apparatus is similar to the described for haplogyne spiders, with some specific variations; 3) sperm cells of this spider have plesiomorphic characteristics as an elongated acrosome and a short postcentriolar elongation; 4) male gametes are transferred to the female as a synspermium, with 4 sperm cells, in a syncytium, inside a common cytoplasm delimitedated by a common plasma membrane; 5) spermathecae are cul-de-sac type, with a pseudostratified epithelium formed by glandular unities producing a glycoproteic secretion; 6) females that have laid eggs previously and others, collected at oviposition had free sperm cells in the spermathecal ducts. This work represents a contribution to better knowledge of the organization of the reproductive system in spiders which is important for the discussion of evolutive and phylogenetic aspects in Araneae.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 2

**EVALUATION OF FIXATIVE SOLUTIONS FOR ULTRASTRUCTURAL
ANALYSIS OF BROWN SPIDER LOXOSCELES INTERMEDIA (ARANEAE:
SICARIIDAE) TISSUES**

CAPÍTULO 3

ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF SPERMIOGENESIS AND SYNSPERMIA IN THE BROWN SPIDER *LOXOSCELES INTERMEDIA* (ARANEAE: SICARIIDAE)

CAPÍTULO 4

**THE FEMALE GENITALIA MORPHOLOGY AND THE ARRANGEMENT
OF SPERM CELLS IN THE BROWN SPIDER *Loxosceles intermedia* MELLO-
LEITÃO (1934) (ARANEAE: SICARIIDAE)**

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES