

INTRODUÇÃO

1.1. A ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia*

O gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1832, de distribuição cosmopolita, composto por cerca de 30 espécies na América do Sul (Gertsch, 1967), é representado por aranhas primitivas e acribeladas. São pequenas, de coloração em tons de marrom, apresentam seis olhos dispostos em três díades, e pernas longas e finas (Marchioro et al., 2004).

Pertencem ao grupo das aranhas haplóginas, as fêmeas possuindo fenda genital simples e conduto único entre o útero e o fundo da espermateca, e os machos apresentando bulbo copulatório do tipo simples. Compõem a família Sicariidae, composta por 2 gêneros e 122 espécies (Platnick, 2005).

Das oito espécies registradas no Brasil, quatro ocorrem no estado do Paraná: *L. intermedia*, Mello-Leitão 1934, *L. gauchus* Gertsch, 1967, *L. laeta* (Nicolet, 1849), e *L. hirsuta* Mello-Leitão, 1931 (Marques da Silva e Fischer, 2000).

São características específicas da aranha marrom *Loxosceles intermedia*, espécie predominante e que melhor está distribuída no município de Curitiba, Paraná (Fischer 1994): tamanho médio de 16 mm, poucos pêlos no corpo de coloração marrom-avermelhada, disposição característica dos pêlos na região do cefalotórax, que por sua vez apresenta sulcos laterais menos curvos, e presença de dois receptáculos seminais nas fêmeas (Mello-Leitão, 1934). Têm índole mansa, picando somente quando comprimidas contra o corpo. Sua peçonha é do tipo proteolítica e hemolítica, podendo produzir reações cutâneas (dermonecrose) e/ou viscerais levando, em alguns casos, a óbito (para revisão, vide Silva et al., 2004).

1.2. DADOS BIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS

São animais sedentários, apresentando hábito noturno e comportamento defensivo. Constroem teia irregular, constituída por fios grosseiros e pegajosos, sendo encontradas sob troncos de árvores caídos e entulhos, preferencialmente ocupando espaços escuros, ao abrigo das intempéries do ambiente. Toleram temperaturas variando de 8 a 43°C e sobrevivem sem alimento por prolongados períodos de tempo (Futrell, 1992, citado por Silva et al., 2004). Alimentam-se de pequenos insetos e servem de alimento para anfíbios, répteis e aves. Com um ano de vida atingem a maturidade sexual (Fischer, 1996). Apresentam dimorfismo sexual, sendo normalmente as fêmeas maiores que os machos. Estes apresentam palpos com os tarsos modificados, os pedipalpos, especializados na transferência de espermatozóides (Gilbert, 1997).

L. intermedia se reproduz preferencialmente nos meses mais quentes do ano, podendo depositar uma média de 20 ovos por postura (Andrade et al., 1999), dos quais eclodem as aranhas jovens em 46 dias (Fischer 1996). A fêmea constrói uma teia complexa, a ooteca, em formato de saco, onde os ovos são acondicionados no momento da postura. As fases iniciais do desenvolvimento embrionário para esta espécie foram investigadas por Ferreira (2001), que descreveu os ovos do tipo centrolécito, clivagem do tipo superficial, além da blastulação, para esta espécie de aranha. Após a eclosão, as pré-larvas sofrem ainda duas mudas antes de deixar a ooteca em busca de alimento; mais 4 a 7 mudas ocorrerão antes que os animais atinjam a maturidade sexual (Fischer, 1996).

Os órgãos sexuais internos são pares e de posicionamento ventral no interior do abdome, para machos e fêmeas. Estas possuem ovários alongados, nos quais os ovócitos se desenvolvem presos à parede ventral do epitélio ovariano, recobertos por uma espessa banda protéica, além da lâmina basal (Morishita, 2003). A mesma autora caracteriza os estágios de desenvolvimento dos ovócitos e sua relação com as células do pedúnculo germinativo, análogas às células foliculares presentes ao redor dos ovócitos, em outras espécies animais. As células do pedúnculo formam uma unidade

celular distinta e intimamente conectada à face dorsal do ovócito, e entre elas Morishita (2003) relata a presença da molécula de caderina, sugerindo a existência de junções de adesão. A marcação para caderina desaparece no momento da liberação do ovócito para o lúmen ovariano. Após este acontecimento restam as células do pedúnculo presas à banda protéica, constituindo o folículo vazio, uma cicatriz na parede do ovário.

As primeiras observações sobre a morfologia e a gametogênese masculina para esta espécie de aranha estão apresentadas nos capítulos seguintes deste trabalho.

Durante a cópula das aranhas, o macho introduz o palpo na fenda genital da fêmea, expelindo o esperma no interior dos receptáculos seminais ou espermatecas (Gilbert, 1997). Gertsch (1967) descreve a anatomia dos pedipalpos, que apresentam tibia conspícua com um distintivo êmbolo, e espermatecas bem separadas e sem glândula acessória, em *L. intermedia*.

A fecundação nas aranhas é um assunto pouco explorado e controverso. Valente (1984) discute a fecundação em *Romphobetens sorocabae*, hipoteticamente descrita como sendo externa, uma vez que a fêmea é observada liberando os ovos e um líquido, de modo intercalado, e, posteriormente, fechando a ooteca e a girando, como se estivesse misturando os ovos com a secreção. Suzuki e Kondo (1994) relatam terem observado em *Achaearanea japonica* o núcleo espermático aproximadamente a uma distância de 50 μm da superfície do ovo, e que, três horas e 30 minutos após a oviposição, a primeira divisão nuclear foi observada no centro da célula. E Suzuki (1995) descreve para *A. tepidariorum* uma fertilização interna, a partir de observações, em microscopia de luz e eletrônica, de ovos que haviam acabado de serem liberados pela fêmea, já na fase de telófase da primeira clivagem. Para a aranha marrom *L. intermedia* não existem relatos dos aspectos que envolvem a interação ovócito e espermatozóide no momento da fertilização.

Pelo descrito, nota-se que *L. intermedia* é um animal rústico, que sobrevive bem com escassez de alimento e grandes variações de temperatura. O aumento da sua população, observada em Curitiba e região é atribuída ao grande crescimento das cidades com conseqüente destruição do seu habitat e desaparecimento dos seus

predadores naturais. Como resultado, essas aranhas encontraram no ambiente domiciliar um novo habitat, com conseqüente aumento dos casos de loxoscelismo no município de Curitiba e arredores, hoje sendo considerado um problema de saúde pública. Dentro das casas a aranha marrom se aloja nos rodapés e fundo de móveis, um ambiente excelente para sua sobrevivência e reprodução. O sucesso reprodutivo dessa espécie é um aspecto que desperta a atenção dos pesquisadores para a realização de trabalhos no campo da dinâmica da reprodução, como realizado por Fischer (1996), bem como no âmbito da morfologia funcional do sistema reprodutor feminino, além do desenvolvimento embrionário inicial (Ferreira, 2001, Morishita, 2003, Morishita et al., 2003, Santiago Filha, 2003 e Florecki, 2004).

1.3. A ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* E LOXOSCELISMO

No Brasil, os acidentes ocasionados por picada de aranhas do gênero *Loxosceles* estão documentados a partir de 1954 (dados do Centro de Epidemiologia do Paraná), com maior incidência no estado do Paraná, particularmente em Curitiba e Região Metropolitana. Entre as décadas de 80 e 90 foram registrados de 595 a 923 casos, havendo um aumento no decorrer desta década, com pouco mais de 2.000 casos registrados em 1.994 e 1.996. Houve um aumento para 3.000 casos em 1.999, reduzindo para 2.262 casos no ano de 2.000. As estatísticas indicam uma maior freqüência nos acidentes durante os períodos mais quentes do ano, e demonstram que casos de loxoscelismo ocupam primeiro lugar em ocorrências, comparados com outros acidentes toxicológicos no Paraná. Os acidentes ocorrem principalmente em ambiente doméstico, e os locais do corpo frequentemente lesionados são as regiões proximais dos membros inferiores e superiores e no tronco. Essas lesões causadas pela picada da aranha marrom ocorrem principalmente pelo reflexo de defesa do animal quando comprimido contra o corpo do homem, mais frequentemente durante o sono ou no momento de vestir-se ([www. saude.pr.gov.br](http://www.saude.pr.gov.br)).

Os acidentes causados pela picada de *Loxosceles* estão associados a lesões dermonecroticas, além de manifestações sistêmicas incluindo hemólise intravascular,

coagulação intravascular disseminada e falência renal. As reações sistêmicas, apesar de ocorrerem em menor número de casos, podem levar ocasionalmente a óbito. As moléculas descritas no veneno de *L. intermedia* incluem esfingomielinase D, proteína LiDl recombinante (31,4KDa, ação antigênica), Loxolisina A (20-28KDa, ação fibronectinolítica e fibrinogenolítica), Loxolisina B (32-35KDa, ação gelatinolítica), serino protease (85KDa, ação gelatinolítica), e proteases (hidrolíticas para entactina, heparan sulfato e membrana basal) (Silva et al., 2004). O mecanismo de ação do veneno nas lesões local e sistêmica ainda está sendo investigado. A ação conjunta do veneno da aranha marrom e *Clostridium perfringens*, isolada da presa da aranha, resulta em um aumento da lesão dermonecrótica, o que sugere a participação dessa bactéria no processo (Monteiro et al. 2002).

1.4. O ESPERMATOZÓIDE E O PROBLEMA DA REPRODUÇÃO

“Como o espermatozóide e o gameta feminino, que são células altamente especializadas, se separam da sua origem para formar um novo organismo, e quais são as instruções no seu núcleo e citoplasma que as levam a funcionar dessa maneira?”

Scott F. Gilbert (2004)

As primeiras observações feitas a respeito do espermatozóide de aranha, que datam do séc. XIX, foram realizadas por Bertkau (citado por Michalik et al., 2004). Este descreveu em detalhes os espermatozóides de algumas espécies de aranhas, utilizando-se de algumas características destas células para definir alguns grupos taxonômicos (Michalik et al., 2004). A espermatologia ganha então sua importância no campo da filogenia, e, com o advento da microscopia eletrônica, uma análise da constituição celular mais detalhada é realizada, permitindo, no caso dos espermatozóides, utilizá-la como base para a identificação dos taxons ao nível de famílias e gêneros animais. Esse tipo de abordagem, iniciado por Franzén (1956,

citado por Alberti, 1990), que relaciona a morfologia do espermatozóide ao modo de fertilização, resultou em inúmeros estudos de espermatologia comparativa, abrangendo praticamente todos os grandes Filos animais.

As primeiras descrições ultraestruturais de espermatozóides de aranha foram realizadas por Osaki em 1969. Trabalhos subseqüentes reúnem um considerável volume de informações e interpretações (Alberti, 1990, Michalik et al., 2003). Os espermatozóides de aranhas diferem na sua morfologia, muito embora sua constituição básica siga o padrão descrito para metazoários no geral, sendo composto de um complexo acrosomal (com vesícula acrosomal, espaço subacrosomal e filamento acrosomal), um núcleo condensado (geralmente alongado e apresentando um canal nuclear e uma fossa de implantação do flagelo posterior), e um flagelo (cuja fórmula básica é $9 \times 2 + 3$). As formas de transferência, resultantes do enrolamento e encapsulamento dos espermatozóides, também variam entre diferentes grupos de aranhas, tendo, como a morfologia dos espermatozóides, implicações filogenéticas: coenospermia, em que vários espermatozóides são contidos no interior de uma cápsula protéica, é considerada a forma mais primitiva de transferência; cleistospermia é a forma em que espermatozóides enrolados são encapsulados individualmente; e sinspermia, considerada uma forma de transferência apomórfica (mais derivada), na qual conjuntos de espermatozóides encontram-se envoltos por um citoplasma e membrana plasmática comuns, além da cápsula protéica externa.

A observação e descrição dos aspectos supracitados requerem o emprego de técnicas de microscopia eletrônica. Para tanto se deve ter um máximo de rigor na preparação das amostras, levando-se em consideração as características dos fluidos internos do espécime que se deseja estudar, para evitar que artefatos resultantes de soluções com osmolalidade e concentrações não adequadas, ao animal objeto do estudo, levem a interpretações errôneas das imagens. O capítulo 2 desta tese traz uma investigação sobre a fórmula fixativa que melhor se adapta às características próprias da *L. intermedia*.

No capítulo 3 desta tese, trazemos a caracterização ultraestrutural das etapas da espermiogênese e da sinspermia para a aranha marrom *L. intermedia*, uma vez que

esses aspectos não foram ainda descritos para esta espécie. Uma investigação mais profunda a respeito da funcionalidade e otimização da reprodução em função dos aspectos descritos – uma espermatologia funcional – deverá ser realizada na seqüência, uma vez que trabalhos envolvendo tais aspectos são raros em Araneae.

Nas aranhas os espermatozóides produzidos nos testículos passam por um conjunto de canais e atingem o exterior através da fenda genital, na região ventral do abdome. Estes são captados pelos pedipalpos modificados, que, no momento da cópula, têm seus bulbos inseridos na fenda genital da fêmea, sendo os espermatozóides depositados no interior das espermatecas, onde podem ficar estocados por prolongados períodos de tempo (Uhl, 1994). O epitélio da espermateca tem função glandular e produz uma secreção cuja função ainda não é bem conhecida. O fato de que os espermatozóides podem ficar estocados por meses neste ambiente sugere um papel nutritivo para a secreção da espermateca. A morfologia das espermatecas de *L. intermedia*, coletadas em quatro diferentes situações, antes e após a cópula, é discutida no capítulo 4 desta tese, objetivando conhecer melhor esta estrutura e estabelecer novas linhas de investigação que levem à elucidação das alterações ocorridas nos espermatozóides durante o período em que permanecem no interior dessas estruturas, e qual o seu possível papel na preparação dos gametas masculinos para a fecundação.

1.5. OBJETIVOS

Pouco ainda se conhece a respeito da biologia reprodutiva da aranha marrom. Aspectos sobre a gametogênese, a cópula e a fertilização são pontos importantes e que devem ser investigados visando fornecer subsídios para futuras pesquisas que forneçam dados que possam vir a serem utilizados no controle populacional desta espécie.

A adequação dos protocolos para o preparo de amostras para microscopia eletrônica, o estudo da espermatogênese e as condições de estocagem dos espermatozóides no interior do aparato genital feminino compõem o objetivo do

presente estudo, haja vista que existe uma escassez de informações sobre estes aspectos da reprodução da aranha marrom *L. intermedia* na literatura.

Espera-se também contribuir para a ampliação dos conhecimentos e melhor compreensão do sistema reprodutor, não somente da espécie em pauta, mas também para as espécies de Araneae em geral.

1.6. REFERÊNCIAS

ALBERTI, G. Comparative spermatology of Araneae. **Acta Fenica** 190: p.17-34,1990.

ANDRADE, R.M.G. de; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon** 37, p.627-632, 1999.

FERREIRA, S.A. **Análise dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário da aranha marrom “*Loxosceles intermedia*”**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FISCHER, M.L. Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1832, no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, Publicação da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, v. 3, n. 38, p. 66-86, 1994.

FISCHER, M.L. **Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae: Sicariidae) no município de Curitiba, Paraná**. Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FLORECKI, M.M. **Estudo ultraestrutural e imunocitoquímico do ovário de fêmeas jovens de *Loxosceles intemedia***. Curitiba, 2003 (Monografia da conclusão do

curso de bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History.**, v. 136, article 3, New York, 1967.

GILBERT, S.F. **Embriology**. Constructing the organism. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 7. ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2004.

MARCHIORO, C.A.; FISCHER, M.L.; MARQUES DA SILVA, E. (2004). Desenvolvimento pós-embrionário de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934, *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. gaúcho* Gertsch, 1967 (Araneae: Sicariidae) criadas sob condições de alimentação monoespecífica. <http://www.biotemas.ufsc.br/pdf/volume181/p93a112.pdf>.

MARQUES DA SILVA, E.; FISCHER, M.L. Occurrence of species of the genus *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) in the Paraná State. **Anais da Reunião Científica Annual do Instituto Butantan**, São Paulo, Brasil, p.51, 2000.

MELLO-LEITÃO. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles* Lowe. **Ann. Acad. Brás. De Ciencias**, v. VI, n. 2, 1934.

MICHALIK, P.; GRAY, M.R.; ALBERTI, G. Ultrastructural observations of spermatozoa and spermiogenesis in *Wandella orana* Gray, 1994 (Araneae: Filistatidae) with notes on their phylogenetic implications. **Tissue & Cell** 35: p. 325-337, 2003.

MICHALIK, P.; HAUPT, J.; ALBERTI, G. On the occurrence of coenospermia in mesothelid spiders (Araneae: Heptathelidae). **Arthropod Structure & Development**, 33: p.173-181, 2004.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, 40, p.409-418, 2002.

MORISHITA, R. **Estudo das interações entre ovócitos e células foliculares no ovário da aranha-marrom, *Loxosceles intermedia***. Curitiba, 2003 (Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MORISHITA, R.; FERREIRA, S.A.; SANTIAGO FILHA, A.; FARACO, C.D. Studies on oogenesis and oviposition in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). **The Anatomical Record** part A, 273A: p.575-582, 2003.

OSAKI, H. Electron microscope study on the spermatozoon of the liphistid spider *Hepathela kimurai*. **Acta Arachnol.** 22, p.1-12, 1969.

PLATNICK, N.I., 2005. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.

SANTIAGO FILHA, A.C. **Estudo morfológico e imunocitoquímico do ovário de fêmeas jovens de *Loxosceles intermedia*, Mello-Leitão, 1934 (Araneae: Sicariidae)**. Curitiba, 2003 (Monografia da conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SILVA, P.H. da; SILVEIRA, R.B. da; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, 44: p.693-709, 2004.

SUZUKI, H. Fertilization occurs internally in the spider *Achaearanea tepidariorum* (C. Koch). **In vertebrate Reproduction and Development**, 28: 3, p.211-214, 1995.

SUZUKI, H.; KONDO, A. The second maturation division and fertilization in the spider *Achaearanea japonica* (Bös. Et Str.). **Zoological Science**, 11, p. 433-439, 1994.

UHL, G. Ultrastructure of the accessory glands in the female genitalia of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholocidae; Araneae). **Acta Zoologica (Stokholm)** v. 75, p. 13-25, 1994.

VALENTE, M.M. (1984). **Estudo anátomo-histológico do aparelho genital da fêmea de *Romphobetens sorocabae* Mello-Leitão, 1923 (Araneae – Aviculariidae)**. Botucatu, 1984. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.