

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE JOVENS E
ADULTOS DE *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO (1934) (ARANEAE: SICARIIDAE),
COM ÊNFASE NOS SEGMENTOS DO DUCTO E DA AMPOLA: UMA PERSPECTIVA
EVOLUTIVA

ALINE MARGRAF

Ponta Grossa

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE JOVENS E
ADULTOS DE *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO (1934) (ARANEAE: SICARIIDAE),
COM ÊNFASE NOS SEGMENTOS DO DUCTO E DA AMPOLA: UMA PERSPECTIVA
EVOLUTIVA

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

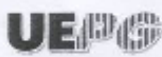
Ponta Grossa

2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

M329a Margraf, Aline
Análise morfológica do sistema reprodutor masculino de jovens e adultos de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (ARANEAE : SICARIIDAE) , com ênfase nos segmentos do ducto e da ampola : uma perspectiva evolutiva./ Aline Margraf. Ponta Grossa, 2009. 109f.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração : Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná.
Orientadora : Profa. Dra. Maria Albertina de Miranda Soares
1. Aranha marrom. 2. Infiltração. 3. *Loxosceles intermedia*. 4. Microscopia eletrônica de varredura.
I. Soares, Maria Albertina de Miranda. II.T.

CDD : 595.44



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 05/2009

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **ALINE MARGRAF**. Aos trinta dias do mês de setembro de dois mil e nove, no Auditório do CIPP da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **ALINE MARGRAF**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares (orientadora), Cristina Lúcia Sant'Ana Costa-Ayub (co-orientadora), Dr^a Henriette Rosa de Oliveira-Emílio, Dr^a Márcia Regina Paes de Oliveira e Luís Fernando Fávaro. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao(a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Análise Morfológica do Sistema Reprodutor Masculino de Jovens e Adultos de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae:Sicariidae) com Ênfase nos Segmentos do Ducto e da Ampola : uma Perspectiva Evolutiva**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Ponta Grossa, 30 de setembro de dois mil e nove.

Prof^a Dr^a Maria Albertina de Miranda Soares

Prof^a Dr^a Cristina Lúcia Sant'Ana Costa Ayub

Prof^a Dr^a Henriette Rosa de Oliveira-Emílio

Prof^a Dr^a Márcia Regina Paes de Oliveira

Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro

Orientador

Prof(a). Dr(a) Maria Albertina de Miranda Soares

Co-orientador

Prof(a). Dr(a).Cristina Lúcia Sant'ana Costa Ayub

Dedico este trabalho aos meus pais, Ildemar e Leoni, que me proporcionaram uma educação voltada para o crescimento pessoal, intelectual e profissional.

Agradecimentos

À amiga e orientadora Tina pela orientação e exemplo, não somente na linha de pesquisa, mas também de humildade e ética.

À amiga e co-orientadora Cris, pelos momentos de descontração em meio às discussões, e por mostrar que tudo pode ser resolvido com força vontade e sorriso nos lábios.

À professora Cláudia, pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos.

À professora e amiga Ana Carolina, pelas palavras de apoio e incentivo, foram sempre muito bem vindas.

À amiga Mônica, pelo companheirismo, pelos risos, pelos happy hours, pelas fofocas, e principalmente, pela prestatividade e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos colegas de laboratório, Rafaela, João Marcos, Igor, Felipe, Patricia, Valquíria, Tatiane, Douglas e Larissa pela amizade e companheirismo.

À amiga de sempre Marinês, como é difícil expressar a gratidão por toda sua simpatia, competência e disposição pra ajudar sempre, mesmo que seja com uma palavra de fé. Ninguém que passa por aqui te esquece!

Aos colegas de mestrado Neto e Simoni, por sempre estarem dispostos a ajudar.

À coordenação do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, e em especial aos funcionários pela ajuda.

À coordenação do Centro de Microscopia Eletrônica do CIPP, UEPG, em especial ao professor Adilson e ao técnico Nilton.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva UEPG, pelos ensinamentos e apoio;

À minha avó “Emilinha” (*in memoriam*) pelo exemplo de vida, força de vontade e garra, que sempre levarei comigo!

Ao meus irmãos, de um modo geral, obrigada pelo ciúme saudável que sempre tiveram, o que fez de mim sua eterna protegida. Alex, obrigada por todo o apoio e sábios conselhos que sempre fizeram de você meu exemplo de perseverança e bom caráter; Ana, pelo carinho em me receber na casa de vocês sempre que precisei. Alisson, obrigada pelas cobranças e incentivo pra chegar ao fim deste trabalho. Alencar, obrigada pela credibilidade e apoio, agradeço também pelos momentos de descontração que sempre tornam a vida mais leve.

Ao Rafael, muito obrigada pela credibilidade, pela confiança e pelas palavras de incentivo. Mesmo chegando no finalzinho, você fez toda a diferença!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, Muito Obrigada!!

Resumo

Loxosceles intermedia é uma espécie de aranha venenosa amplamente distribuída na região de Curitiba e Campos Gerais do Paraná. Há descrições na literatura sobre o comportamento reprodutivo dessa espécie e, mais recentemente, estudos têm sido realizados a fim de descrever o desenvolvimento pós-embrionário do sistema reprodutor masculino. O sistema reprodutor masculino adulto é composto por dois testículos, ligado ao *vas deferens* por duas estruturas, um ducto e uma ampola, ainda não descritas para outras espécies de aranhas. Neste trabalho foram descritos os aspectos morfológicos do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, a morfologia do ducto e da ampola no macho adulto e discutidas as possíveis implicações funcionais e evolutivas destes segmentos sobre a reprodução de *L. intermedia*. Para a análise em microscopia óptica, os machos em diferentes fases do desenvolvimento foram anestesiados e sacrificados. Seus abdomens foram removidos e fixados em 4% paraformaldeído / tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, e incorporado em historesina (Leica). Posteriormente, os cortes seriados a 5 µm foram submetidos à coloração HE e reação PAS. Para a análise em MEV, machos adultos foram dissecados e o conjunto testículo-ducto-ampola foi removido e fixado em cacodilato de sódio 0,2 M, glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%, pH 7,4. Os tecidos foram desidratados e secos em série alcoólica e ponto crítico. Posteriormente, os tecidos foram cobertos com ouro e analisados por MEV. Considerando-se o fato de que os órgãos do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* são pequenos e frágeis, o que torna difícil a dissecação para observação em MEV pelos métodos usuais, neste trabalho também foram avaliados alguns protocolos de infiltração, utilizando parafina, paraplast e PEG (por tempo curto e longo prazo de infiltração), para a obtenção de cortes seriados, bem como testou-se três substâncias de adesão às lamínulas (albumina 5,5%, gelatina 0,1% e gelatina 1%), as amostras de tecidos foram submetidos a infiltração e cortes a 20 µm foram obtidos. Estes foram colocados em lâminas de vidro, lavados com solvente ou água, secos à temperatura ambiente, revestidos com ouro e analisados em MEV. Infiltração com PEG por um tempo curto e aderência com gelatina 1% foi o melhor protocolo resultando na manutenção da forma das células e das características do tecido. No desenvolvimento do sistema reprodutor masculino da aranha marrom foi observado que a maturação do testículo é o primeiro evento a acontecer. Após o aparecimento da *synspermium* dentro dos testículos, a diferenciação do ducto, ampola e *vas deferens* é observada e, finalmente, a modificação externa do palpos em órgãos copulatórios ocorre. No macho adulto, o tecido do ducto é composto de um epitélio não secretor, sem uma luz definida. A função do ducto é, provavelmente, a seleção de espermatozóides viáveis. A parede da ampola é composta por um epitélio secretor, cuja secreção glicoprotéica envolve o *synspermium*. A secreção liberada pela ampola pode estar envolvida em aspectos distintos da funcionalidade dos gametas, bem como pode também estar relacionada a mecanismos de seleção sexual, ainda não definidos para esta espécie de aranha. Conclui-se que, esta novidade morfológica no sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* parece constituir um importante evento evolutivo na reprodução de aranha.

Palavras-chave: aranha-marrom, infiltração, *Loxosceles intermedia*, microscopia eletrônica de varredura.

Abstract

Loxosceles intermedia is a poisonous species widely distributed in the region of Curitiba and Campos Gerais of the Paraná State. There are descriptions in the literature concerning the reproductive behavior of this species and, more recently, studies have been carried out in order to describe the post-embryonic development of the female reproductive system. The adult male reproductive system is composed by two testicles connected to the *vas deferens* by two structures, a duct and an *ampulla*, not yet described for other spider species. Then in this work were described the morphological aspects of the development of the male reproductive system, the morphology of the duct and *ampulla* in the adult male and discussed possible functional and evolutionary implications of this segments on reproduction of *L. intermedia*. For the analysis in light microscopy, male animals at different stages of the development were etherized and sacrificed. Their abdomens were removed and fixed in 4% paraformaldehyde/ 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and embedded in historesin (Leica). Subsequently, the serial 5 µm sections were submitted to HE staining and PAS reaction. For the analysis in SEM, adult male animals were dissected and their whole testis-duct-*ampulla* was removed and fixed in 0.2 M sodium cacodilate, 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde, pH 7.4. The tissues were dehydrated and dried in alcohol series and critical point, respectively. Subsequently, the tissues were coated with gold and analyzed by SEM. Considering the fact that the organs of the male reproductive system of *L. intermedia* are tiny and fragile, which makes them difficult to dissect for observation in SEM by the usual methods, in this work was also evaluated some protocols, using paraffin, paraplast or PEG (for short and long time of infiltration) as infiltration medium, for obtaining serial sections, as well as three adherence substances to slides (5.5% albumin, 0.1% gelatin and 1% gelatin, the tissues samples were submitted of infiltration and 20 µm sections were obtained, placed on glass slides, washed with solvent or water, dried at room temperature, coated with gold and analyzed in SEM. Infiltration with PEG for a short time and adhesion with 1% gelatin was found to be the best protocol resulting in the maintenance of the cell shape and tissue characteristics. Following the development of the male reproductive system of the brown spider it was observed that the maturation of the testis is the first event to take place. After the appearance of *synspermium* inside the testicles, the differentiation of the duct, *ampulla* and *vas deferens* is observed, and finally the external modification of the palps in copulatory organs occurs. In adult male, the tissue of the duct is composed of a non-secretory epithelium, without a defined lumen. The function of the duct is probably the selection of viable sperm cells. The *ampulla* wall is composed of a secretory epithelium whose glycoprotein secretion involves the *synspermium*. The secretion released by the *ampulla* could be involved in distinct aspects of the functionality of the gametes. The *ampulla* secretion could also be related to mechanisms of sexual selection, not yet established for this species of spider. In conclusion, this morphological novelty in *L. intermedia* male reproductive system appears to constitute an important evolutionary event on spider reproduction.

Key words: brown spider, infiltration, *Loxosceles intermedia*, scanning electron microscopy.

Lista de figuras

FIGURA1. Esquema geral da anatomia visceral de aranhas em corte

longitudinal.....[22](#)

FIGURA 2. Desenho esquemático da vista interna do aparelho reprodutor masculino de

Loxosceles intermedia.....**22**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1 ESTRUTURA DO SISTEMA REPRODUTOR DE <i>L. intermedia</i>	12
1.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR DE <i>L. intermedia</i>	24
1.3. ESTUDOS EVOLUTIVOS E FILOGENÉTICOS.....	25
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	27
3.1.1 MANUTENÇÃO DOS BESOUROS <i>Tenebrio molitor</i> EM LABORATÓRIO.....	28
3.2 MANEJO DAS CÓPULAS PARA OBTENÇÃO DE ANIMAIS EM ESTÁGIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO.....	28
3.3 MICROSCOPIA DE LUZ.....	29
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	31
4 RESULTADOS.....	34
4.1. CAPÍTULO 1 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE JOVENS E ADULTOS DE <i>L. INTERMEDIA</i> MELLO-LEITÃO (1934) (ARANEAE: SICARIIDAE), COM ÊNFASE NOS SEGMENTOS DO DUCTO E DA AMPOLA: UMA PERSPECTIVA EVOLUTIVA.....	35
4.2CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DE CORTES DE ESTRUTURAS DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DA ARANHA MARROM <i>Loxosceles intermedia</i> MELLO-LEITÃO 1934	

(ARANEAE: SICARIIDAE) COM VISTAS À ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	69
5.DISSCUSSÃO GERAL.....	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1 Introdução Geral

A espécie de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) pertence ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Ordem Araneae e Família Sicariidae.

A família Sicariidae é caracterizada por aranhas cujas fêmeas são haplóginas, ou seja, não apresentam uma placa esclerotizada sobre os orifícios genitais (denominada epígino) e possuem um par de canais fertilizantes internos (GERSTCH & ENNIK, 1983; SCHNEIDER-RIBEIRO, 2007).

As aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken e Lowe (1832) possuem coloração em diferentes tons de marrom, pernas longas e finas e olhos homogêneos dispostos em três díades (MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2000). Esses animais apresentam quelíceras com orientação vertical cujo movimento é lateral (RASH & HODGSON, 2002).

O problema da sistemática do gênero *Loxosceles* relaciona-se com sua natureza haplógina, em que há uniformidade nos caracteres somáticos, especialmente da genitália, além das grandes semelhanças comportamentais, devido a uma explosiva radiação adaptativa que produziu espécies muito próximas, provavelmente, por explorarem habitats semelhantes (GERSTCH, 1967; GERSTCH & ENNIK, 1983; SCHNEIDER-RIBEIRO, 2007).

Na década de 1960, a taxonomia das espécies do gênero

Loxosceles foi alvo de inúmeros debates, principalmente, com respeito ao número de sinonímias do grupo ocorrente na América do Sul (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2006).

As aranhas do gênero *Loxosceles* constroem teia irregular, constituída por fios grosseiros e pegajosos, sendo encontradas sob troncos de árvores caídos e entulhos e ocupam preferencialmente espaços escuros, ao abrigo das intempéries do ambiente. Estes animais toleram temperaturas variando de 8 a 43°C e sobrevivem sem alimento por prolongados períodos de tempo (FUTRELL, 1992, *apud* MARQUES-DA-SILVA, 2002).

O gênero *Loxosceles* é cosmopolita e possui mais de 100 espécies que têm como centro de origem a África e as Américas. Destas espécies, 20 são endêmicas da África, 50 da América do Norte e Central e 30 da América do Sul (GERSTSH, 1967).

No Brasil, são registradas oito espécies: as endêmicas são *L. similis* Moenkhaus (1998) (PA, SP, MG e MS), *L. gaucho* Gerstch (1967) (RS e SP), *L. amazonica* Gerstch (1967) (AM, MG e MA) e *L. puortoi* Martins *et al.* (2002) (TO) enquanto *L. adalaida* Gertsch (1967) (RJ), *L. hirsuta* Mello-Leitão (1931), *L. laeta* Nicolet (1849), e *L. intermedia* Mello-Leitão (1934) ocorrem também nos países vizinhos. As três últimas e *L. gaúcho* ocorrem também no Estado do Paraná (GERSTSH 1967; MARTINS *et al.*, 2002; MARTENS 1976; MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2000).

O grupo gaúcho é composto por *L. gaúcho*, *L. similis* e *L. adelaida*. A espécie *L. gaúcho* é predominante e seus registros são, principalmente, no Estado de São Paulo (CARDOSO *et al.*, 1988), mas também ocorre no Paraná, nos municípios próximos à divisa com São Paulo e Mato Grosso do Sul.

L. hirsuta foi descrita originalmente como ocorrendo somente no Rio Grande do Sul e, apenas recentemente, foi confirmada a sua ocorrência no Estado do Paraná (MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2000; 2005). A espécie *L. hirsuta* parece ser representada por pequenas populações distribuídas por todo estado do Paraná.

Segundo estudo realizado por Marques-da-Silva & Fischer (2005), a espécie *L. laeta* ocorre em 13 municípios e 7 regionais de saúde, predominando nos municípios localizados na região sul do Estado do Paraná. Esta espécie é nativa do sul da América Latina, provavelmente Argentina ou Chile. Inúmeros problemas de sinonímia estão relacionados a tipos encontrados no Peru, Chile e Argentina.

L. intermedia, que é a espécie predominante na região de Curitiba e Campos Gerais, possui tamanho médio de 16 mm, poucos pêlos de coloração marrom-avermelhada com disposição característica na região do cefalotórax, que por sua vez apresenta sulcos laterais menos curvos, além da presença de dois receptáculos seminais nas fêmeas (MELLO-LEITÃO, 1934; FISCHER 1994).

O dimorfismo sexual nesta espécie é notado pela presença nos machos de palpos modificados (pedipalpos) em órgãos copulatórios (bulbo plumoso). As

fêmeas possuem o abdômem mais volumoso que os machos, porém suas pernas são relativamente mais curtas, sendo assim, aparentemente menores que eles.

Fischer (2002), demonstra que a ampla distribuição da *L. intermedia* está relacionada com a especificidade do seu hábito e habitat. A *L. intermedia* é mais generalista do que a *L. laeta* em vários aspectos ecológicos, ocupando desta forma os espaços vazios, obtendo sucesso na colonização de locais com condições ambientais favoráveis.

L. intermedia possui distribuição ampla pelo Estado do Paraná, abrangendo municípios agrupados em 13 regionais de saúde. Existem registros de ocorrências desta espécie em estados do sudeste, como Rio de Janeiro e Minas Gerais, e centro-oeste, como Brasília (MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2005).

O alto grau de infestação de *L. intermedia* (estimado em 97% das residências) intra e/ou peridomiciliariamente e, provavelmente, a alta incidência de acidentes em Curitiba, podem estar relacionados com o comportamento ativo desta espécie, que locomove-se mais e possui hábito generalista com relação aos fatores ambientais, o que proporciona maior contato com o ambiente antrópico. Comparando-se os padrões comportamentais apresentados por *L. intermedia* e *L. laeta*, espécies ocorrentes no município de Curitiba, chegou-se à conclusão que *L. intermedia* tolera mais o filhote coespecífico, que pode ser outro fator responsável por sua predominância no Estado (FISCHER 1994, 2002; FISCHER

& VASCONCELLOS-NETO 2003; MARQUES DA SILVA, 2002). Além do mais, construções humanas oferecem condições de reprodução e desenvolvimento favoráveis, por não estarem expostas a amplas oscilações meteorológicas (FISCHER, 1993, 1996).

Durante a cópula das aranhas, o macho introduz o pedipalpo na fenda genital da fêmea, expelindo o esperma no interior dos receptáculos seminais ou espermatecas (GILBERT, 1997). Gerstch (1967) descreve para *L. intermedia* a anatomia dos pedipalpos como sendo uma tibia conspícua com um distintivo êmbolo e das espermatecas como sendo estruturas separadas sem glândula acessória.

Segundo o Ministério da Saúde (1998), três gêneros de aranhas possuem importância médica no Brasil: *Loxosceles* Heineken e Lowe, 1832, *Phoneutria* Perty, 1833, e *Latrodectus* Walckenaer, 1805.

A picada da aranha marrom *L. intermedia* pode causar uma síndrome necrotizante-hemolítica, conhecida como loxoscelismo, sendo essa a forma mais grave de araneísmo no Brasil cujos acidentes concentram-se principalmente nos estados da região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; CARDOSO *et al.*, 1988, SEZERINO *et al.*, 1998; MÁLAQUE *et al.*, 2002 apud MARQUES-DA-SILVA, 2002).

Segundo Marques-da-Silva (2002), a importância do loxoscelismo no Estado do Paraná é relevante, pois, quando comparado com a ocorrência de outros agravos à saúde, observa-se uma frequência alta de registros, o que levou

os acidentes por animais peçonhentos a ocupar o segundo lugar em notificações no ano de 2001.

Normalmente, a picada é imperceptível e o quadro clínico do envenenamento apresenta duas formas características: a forma cutânea de maior frequência e a forma sistêmica (hemolítica) de menor frequência, porém, de maior gravidade. A forma cutânea é de instalação lenta e progressiva e as principais manifestações clínicas locais são, inicialmente, edema e eritema no local da picada cuja lesão evolui com áreas hemorrágicas mesclada com palidez (“placa marmórea”), com sensação de dor e queimadura ou prurido; após a delimitação da lesão, há formação de crosta necrótica seca que se desprende deixando uma úlcera que pode demorar meses para cicatrização completa. Na forma cutâneo-visceral, observa-se além das manifestações locais, comprometimento clínico devido à hemólise intravascular como anemia, icterícia e hemoglobinúria, que se instalam geralmente nas primeiras 24 h. Nos casos graves, pode haver evolução para insuficiência renal aguda (IRA), de etiologia multifatorial, sendo esta a principal causa de óbito relacionado ao loxoscelismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

O primeiro caso de loxoscelismo documentado foi em 1879, no Tennessee. Existem ainda alguns dados sobre acidentes com aranhas referentes à cerca de cinquenta anos atrás documentados no Chile, e outros posteriormente registrados no Brasil e Estados Unidos. Esses dados são registros de acidentes com aranha marrom evidenciados por um quadro de dermonecrose (MACCHIAVELLO, 1947, ATKIN *et al.*, 1958 e SAMS *et al.*, 2001 *apud* APPEL *et al.*, 2005).

No Brasil, a maioria dos acidentes é registrada nas Regiões Sul e Sudeste, sendo observado um incremento das notificações nos Estados do Sul. No Paraná, as aranhas dos gêneros *Loxosceles* e *Phoneutria* são as principais causadoras de acidentes conhecidos como loxoscelismo e foneutrismo (MARQUES-DA-SILVA, 2002).

Pelo fato das aranhas marrons, aparentemente, não serem agressivas, as picadas ocorrem quando as pessoas comprimem-nas contra o corpo ao vestirem suas roupas ou enquanto dormem (MARQUES-DA-SILVA, 2002).

Em Curitiba, Ribeiro *et al.* (1993) analisaram 923 acidentes loxoscélicos ocorridos entre 1989 e 1990, correspondendo a 52,7% dos acidentes por aracnídeos notificados no Estado no referido período. Os autores verificaram que os acidentes ocorreram em todas as zonas urbanas da cidade, e que *L. intermedia* foi a espécie predominante.

A reprodução de *L. intermedia* ocorre, preferencialmente, entre os meses mais quentes, podendo essa 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 ooteca, em formato de saco, onde os ovos são acondicionados no momento da postura. Ferreira (2001) descreveu as fases iniciais do desenvolvimento embrionário para esta espécie, onde são observados ovos do tipo centrolécito possuindo clivagem superficial. Após a eclosão, ainda dentro da ooteca, as pré-larvas sofrem duas mudas e, posteriormente, 4 a 7

mudas ocorrerão antes que os animais atinjam a maturidade sexual (FISCHER, 1996).

1.2 Estrutura do sistema reprodutor de *L. intermedia*

Em *L. intermedia* os órgãos sexuais internos são pares e posicionam-se ventralmente no interior do abdômem, para machos e fêmeas. Estes encontram-se recobertos pelo hepatopâncreas difuso.

Nas fêmeas, no lúmen dos ovários, pares e tubulares, localizados entre o trato digestório e as glândulas da seda, são liberados os ovócitos os quais se desenvolvem presos à parede ventral do epitélio ovariano, recobertos por uma espessa banda protéica, além da lâmina basal (Figura 1). Após liberados, passam pelo útero, que é formado pela fusão dos dois ovários, onde provavelmente ocorre a fecundação (MORISHITA *et al.*, 2003).

Em fêmeas adultas, o epitélio do ovário secreta grânulos eosinófilos no lúmen (SANTIAGO-FILHA, 2003). Os ovócitos, que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento, ligam-se aos pedúnculos (células epiteliais) da parede ventral do ovário (MORISHITA, 2000).

Morishita *et al.*, (2003) descreveram o desenvolvimento dos ovócitos para *L. intermedia*, sendo ele dividido em 6 estágios: o primeiro caracterizado como imaturo, uma vez que os ovócitos diferem das células do epitélio apenas pela morfologia do núcleo; o segundo caracterizado por ovócitos que começaram a se projetar para fora da face ventral do ovário; o terceiro caracterizado por ovócitos

que já apresentam um volume citoplasmático muitas vezes maior que o das células do epitélio e que se encontram presos ao pedúnculo; o quarto caracterizado por ovócitos que apresentam pequenas inclusões citoplasmáticas de grânulos de vitelo; o quinto caracterizado por ovócitos que apresentam grânulos maiores de vitelo em meio aos de menor tamanho; e o último caracterizado por ovócitos mais volumosos, com células do pedúnculo morfologicamente distintas, sendo maiores e mais alongadas aquelas que se encontram em contato direto com os ovócitos.

Após a cópula, os espermatozóides ficam armazenados em um par de receptáculos seminais denominados spermatecas, as quais são do tipo fundo de saco, e encontram-se separadas espacialmente. Cada spermateca possui um ducto único e longo, para entrada e saída de fluido seminal, através do qual se dá a conexão com o *uterus externus* (UHL, 1994 a, b, 2000; MARGRAF & COSTA-AYUB, 2006). A fertilização é interna e ocorre quando os espermatozóides são liberados das spermatecas no momento da passagem dos ovócitos pelo útero e os quais são depositados na ooteca para o desenvolvimento dos embriões (GILBERT, 1997).

Nos machos, os testículos de *L. intermedia* consistem em um longo par de corpos cilíndricos, os quais se estendem entre a abertura genital e a base interna das fiandeiras, ventralmente ao epistossoma. Uma pequena camada de células achatadas, ricas em actina F, semelhantes a células mióides, cobre os testículos cuja parede é composta por dois tipos celulares: as somáticas e as células da linhagem germinativa. Em contato com a lâmina basal, as células somáticas são

grandes, irregulares, com um núcleo basal e muitas projeções, entre as quais estão as células da linhagem germinativa. As espermatogônias estão presentes na região basal do tecido germinativo e em contato com as células somáticas. Espermatócitos em diferentes fases da meiose são observados, enquanto as espermatídes e os cistos de espermatozóides (com espermatídes iniciais, espermatídes tardias e espermatozóides) são localizados na posição adluminal desse tecido (COSTA-AYUB, 2006).

Cada testículo é conectado ao *vas deferens* por um fino ducto seguido por uma ampola (COSTA-AYUB, 2006). Segundo Michalik (comunicação pessoal), essas estruturas não foram descritas ainda para outras espécies de aranha e são, provavelmente, características espécie-específicas observadas por Costa-Ayub e Faraco (2006) (Figura 2).

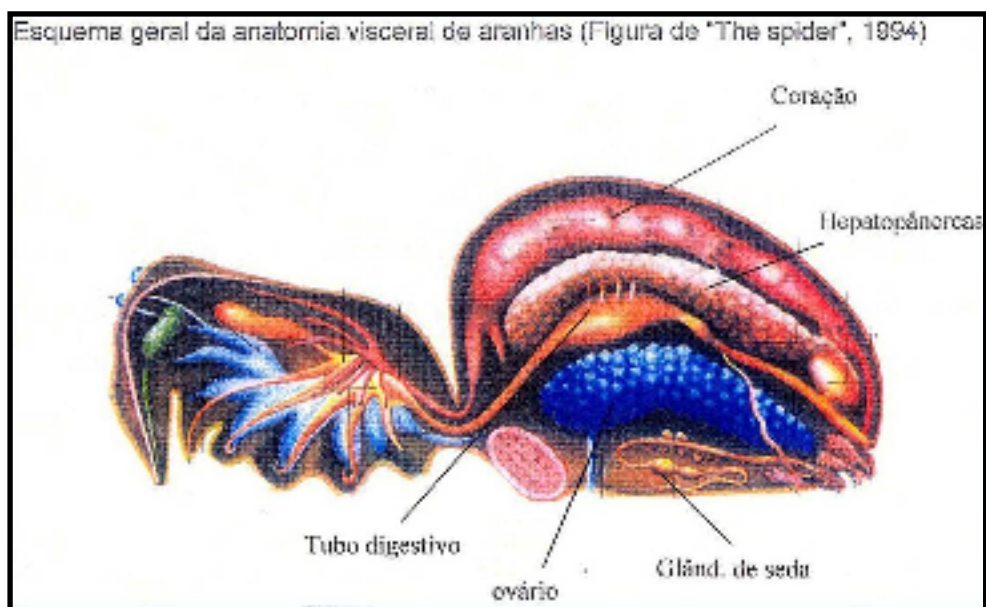


Figura 1. Esquema geral da anatomia visceral de aranhas em corte longitudinal

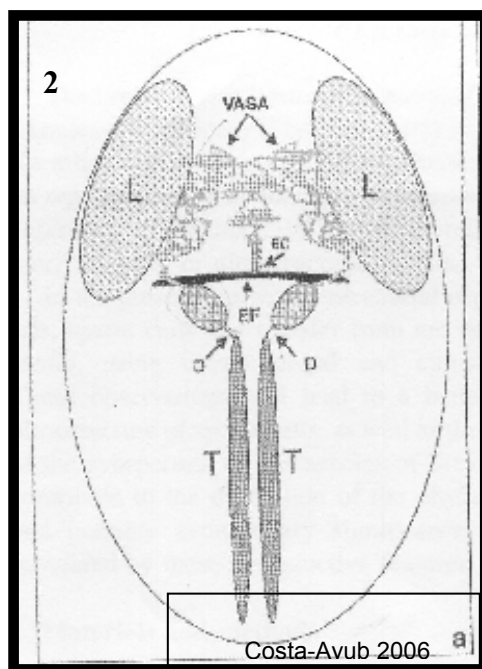


Figura 2. Desenho esquemático da vista interna do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*. A= ampola; EC= canal ejacutório; EF= fenda genital; D= ducto; T= testículos.

O *vasa deferentia* consiste de dois finos, longos e espiralados tubos que percorrem anteriormente entre os pulmões e se fusionam para formar o canal ejaculatório, o qual atinge o sulco epigástrico. Uma pequena camada de células epiteliais com função secretora forma a parede do *vas deferens*. A secreção é PAS e ninhidrina-Schiff positiva, indicando composição de glicoproteínas básicas. No final do *vas deferens*, uma capa de secreção é depositada ao redor de cada unidade *synspermium* (conjunto de espermatozóides envoltos por citoplasma e membrana plasmática comuns), e o conjunto, *synspermia* mais secreção, é liberado durante a cópula (COSTA-AYUB, 2006).

A principal função das secreções, provavelmente, é manter a integridade dos espermatozóides, pois os mesmos são produzidos nos testículos e retidos no trato genital masculino por tempo indeterminado até o momento da cópula (COSTA-AYUB, 2006).

O epitélio da ampola também produz uma secreção glicoprotéica que envolve o *synspermia* e que, certamente, está envolvida com a manutenção da integridade dos espermatozóides, além de outros aspectos de sua funcionalidade (COSTA-AYUB, 2006).

Devido à escassez de estudos sobre a organização dos sistemas reprodutores de aranha, faz-se necessário, primeiramente, que novas pesquisas sejam realizadas, relacionadas à descrição morfológica das estruturas que os compõem. Estes dados podem futuramente contribuir para um melhor entendimento dos processos reprodutivos de aranhas e fomentar discussões

filogenéticas, taxonômicas e evolutivas sobre o grupo. Além de contribuir

com dados para estudos futuros relacionados ao controle populacional da espécie.

1.3 Desenvolvimento do Sistema Reprodutor de *L. intermedia*

Em fêmeas jovens que realizaram a terceira ecdise, tanto o oviduto como o *uterus externus* aparecem como cordões de células, sem luz aberta e, conseqüentemente, sem produção de secreção. A espermateca aparece como um broto ainda em formação. Diferentes fêmeas jovens com quatro mudas apresentam morfologias distintas do aparato genital, sendo encontrado nesta fase animais semelhantes aos de três mudas, bem como animais mais desenvolvidos, com ovidutos, *uterus internus* e *externus* e espermatecas formados, abertos e com deposição de secreção (MARGRAF & COSTA-AYUB, 2006).

Segundo Margraf e Costa-Ayub (2006), o processo de desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, em *L. intermedia*, prioriza a formação dos ovários, uma vez que somente após o surgimento de ovócitos em vitelogênese é que nota-se a diferenciação final dos ductos, dos ovidutos e *uterus externus*, e por último, das espermatecas. A quarta muda é o período de maior modificação morfológica no aparelho reprodutor feminino, a partir da qual este animal torna-se apto para a reprodução.

Segundo a descrição realizada por Fischer (1996) baseada em dados macroscópicos, os machos desenvolvem seu dimorfismo sexual pela modificação

dos palpos em pedipalpos com bulbos copulatórios, a partir da sexta muda e tornam-se capazes de reproduzir.

Os dados sobre o desenvolvimento do aparato genital de aranhas são de extrema relevância para a compreensão das estratégias evolutivas de reprodução desse grupo, porém, este tipo de estudo ainda é bastante escasso na literatura. Assim, a realização de estudos histológicos relacionados ao desenvolvimento interno do aparelho reprodutor de machos de *L. intermedia* torna-se importante para complementar a descrição morfológica do desenvolvimento desse sistema para esta espécie.

1.4 Estudos Evolutivos e Filogenéticos

Diferenças ultraestruturais dos espermatozóides e o modo de transferência dos mesmos entre as espécies têm sido foco de investigações em aranhas, com implicações filogenéticas (ALBERTI, 1990; MICHALIK *et al.*, 2003, 2004a, b). Variações anatômicas no sistema genital masculino da espécie de aranha *L. intermedia* concernente aos canais espermáticos foram primeiramente descrita por Costa-Ayub, (2006).

Segundo Eberhard (*apud* FUTUYMA, 2002), as causas de divergências na morfologia genital de uma espécie são desconhecidas, porém, não se pode descartar o papel na seleção sexual. Portanto, a peculiaridade encontrada no trato genital de machos de *L. intermedia* possivelmente trata-se de uma estratégia evolutiva para adaptação reprodutiva da espécie.

Além do mais, conhecimento a cerca das características morfológicas das espécies é uma das primeiras ferramentas utilizadas no estabelecimento de árvores filogenéticas. Segundo Loman (1903 *apud* MARTENS, 1976), o aparelho genital nos oferece sem dúvida, dentre todos os sistemas do organismo, o caráter diagnóstico mais acurado.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

- Contribuir com dados para as discussões sobre as implicações evolutivas de variações anatômicas no sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* a partir da sua descrição morfológica no nível microscopia de luz e eletrônica de varredura.

2.2 Objetivos específicos:

- Descrever o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* ;
- Descrever a morfologia do ducto e da ampola do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* através das microscopias de luz e eletrônica de varredura;
- Estabelecer o papel do ducto e da ampola no armazenamento e regulação da passagem do *synspermium*;

- Contribuir com dados para a compreensão da estratégia evolutiva de reprodução de *L. intermedia*;
- Avaliar diferentes protocolos para obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. Intermedia* para análises mais acuradas em microscopia eletrônica de varredura.

3 Material e Métodos

3.1 Coleta e manutenção dos animais

Machos e fêmeas adultos foram coletados nas cidades de Ponta Grossa e Palmeira, Paraná, Brasil (25° 11' 16" S/50° 08' 40" O e 20° 24' 46"S/50° 00' 23" O respectivamente). Os machos e fêmeas foram classificados e separados pela observação dos palpos modificados em órgão copulatório (pedipalpo). Os animais foram acondicionados individualmente em potes plásticos com tampa, sendo fornecida água em algodão e larvas de *Tenebrio molitor*, mensalmente.

Os potes contendo cada animal foram acondicionados em caixas maiores de papelão, o que facilitou o seu manuseio e transporte. Estas caixas, por sua vez, foram mantidas em lugar seco, nas dependências do laboratório de Biologia do Desenvolvimento – M69 – SEBISA/DEBIOGEM/UEPG, e protegidas da luz e do calor excessivo, uma vez que esses fatores podem aumentar o estresse e causar a morte dos animais.

3.1.1 Manutenção dos besouros *Tenebrio molitor* em laboratório

Os besouros da espécie *T. molitor* foram obtidos junto a casas de materiais para pesca e acondicionados em um recipiente plástico com tampa parcialmente fechada, permitindo a oxigenação, com a presença de pão envelhecido, farelo de aveia e fornecimento mensal de água por esborrifamento.

3.2 Manejo das cópulas para a obtenção de animais em estágios iniciais de desenvolvimento

Aleatoriamente foram selecionados machos e fêmeas adultos dentre os animais mantidos em laboratório para as cópulas; cada casal foi colocado em um recipiente plástico grande (25cmx25cm) com tampa. Todos os movimentos realizados por ambos, se houve cortejamento ou não e se houve sucesso na cópula bem como seu tempo de duração foram registrados. Os casais que não obtiveram sucesso na cópula foram substituídos, mas antes disso cada fêmea foi colocada com machos diferentes e somente aquelas que rejeitaram os machos foram substituídas. O mesmo procedimento foi feito com os machos, e somente aqueles que não cortejaram nenhuma fêmea foram substituídos. Os machos após a cópula foram recolados aos respectivos potes.

Cada fêmea que obteve sucesso na cópula foi acondicionada em seu pote, sendo fornecida apenas água até a postura de seus ovos e eclosão de seus filhotes. Após a eclosão, os filhotes foram individualizados em potes plásticos, sendo fornecido a eles o mesmo tratamento dos adultos (Item 3.1).

Estes filhotes foram acompanhados e sempre que realizavam alguma ecdise, as exuvias eram retiradas do potes plásticos e as datas de suas retiradas

anotadas nas partes externas das tampas dos potes para um controle do número de ecdises sofridas por cada indivíduo.

Em cada estágio do desenvolvimento (baseado aqui pelo número de ecdises), 3 animais foram selecionados e submetidos aos procedimentos de rotina realizados em estudos de microscopia de luz, descritos no item 3.3.

3.3 Microscopia de Luz

Os animais selecionados foram eterizados individualmente por cerca de 20 minutos, em um vidro com tampa contendo um algodão embebido em éter etílico dentro de uma capela, até que estivessem totalmente anestesiados. Em seguida, cada animal foi preso em uma placa de petri contendo parafina com o auxílio de um alfinete entomológico inserido em seu cefalotórax. Com o auxílio de uma seringa de insulina, injetou-se fixador paraformaldeído (PAF) 4% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.4, pela base das fiandeiras e o abdomen foi separado, em seguida, do cefalotórax com o auxílio de uma tesoura oftalmológica e mergulhado no mesmo fixador, sendo mantido por 2h em temperatura ambiente. A medida das pernas de cada animal foi tomada, sendo registrados o comprimento do fêmur do primeiro par de pernas, bem como do fêmur e das pernas dos segundo e quarto pares. Este procedimento teve como finalidade a manutenção de um cadastro mais detalhado acerca dos animais utilizados nos experimentos.

Os abdomens foram lavados duas vezes em tampão fosfato 0,1M, desidratados em soluções crescentes de etanol, compostas por: álcool 50% por 10 minutos, álcool 70% por duas horas, álcool 80% por dez minutos e álcool 90%

por dez minutos. Em seguida deu-se início ao processo de infiltração, sendo os abdomens submetidos por duas horas a uma solução 1:1 de álcool 90% e historesina conforme instruções do fabricante. Posteriormente, os abdomens foram mantidos por cerca de duas semanas, até que não flutuassem (condição de totalmente infiltrado). Após a infiltração foi preparada uma outra solução de historesina para emblocamento dos abdomens, conforme instruções do fabricante. Este procedimento foi realizado nas dependências do laboratório de Biologia Celular, M67a, SEBISA/DEBIOGEM/UEPG.

O bloco de historesina foi trimado, fixado em um suporte de madeira e encaixado no micrótomo (LEICA RM 2025). Cortes seriados de 5 µm foram obtidos, sendo estes colocados em lâminas contendo gotas de água. As lâminas foram secas em placa aquecida para aderência dos cortes e, posteriormente, submetidas as colorações H&E e histoquímica de Ácido Periódico Schiff (PAS). Este procedimento foi realizado nas dependências do laboratório de Histotécnica, M60, SEBISA/DEBIOGEM/UEPG.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e a fotodocumentação foi realizada com o auxílio de microscópio Nikon acoplado a câmera fotográfica digital Sony 1080. Este procedimento foi realizado nas dependências do laboratório de Biologia Celular, M67a, SEBISA/DEBIOGEM/UEPG.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os animais selecionados foram eterizados como descrito no item 3.3. Com o auxílio de uma seringa de insulina injetou-se pela base das fiandeiras fixador

glutaraldeído (GLUTA) 2,5% e paraformaldeído (PAF) 2% em tampão cacodilato (CACO) 0,2M pH 7,4. Em seguida, dissecou-se os testículos, ductos e ampolas de cada macho adulto e estes foram mantidos no mesmo fixador por 2 horas em temperatura ambiente. As medidas das pernas foram tomadas conforme descrito no item 3.3.

Depois da fixação, os tecidos foram desidratados em gradiente de etanol, cada etapa durando cerca de dez minutos, sendo composta por álcool 50%, 70%, 80%, 90%, e 2X no 100%. Em seguida, o material foi totalmente desidratado em ponto crítico (BAL TEC CPD 030 Critical Point Dryer), na UFPR. Os testículos, ductos e ampolas desidratados foram fraturados com auxílio de pinças, transferidos para um suporte metálico, recobertos com ouro (SCD 030 BALZERS UNION FLSL 9496 BALZERS) na UFPR e analisados em MEV JEOL JSM-6360LV, na UFPR, ou em MEV SHIMADZU SSX 500, no CIPP – UEPG.

Alguns testículos com ductos e ampolas após dissecação e fixação, foram submetidos a diferentes procedimentos de infiltração descritos a seguir:

Para infiltração em Parafina, os materiais foram desidratados em série alcóolica crescente de 70% a 100% por dez minutos; diafanizados em xilol + álcool 100% (1:1), por dez minutos e 2X em xilol, por cinco minutos cada; em seguida os mesmos foram mergulhados em parafina + xilol (1:1), por cinco minutos, seguido de 3X parafina pura, por 15 minutos cada. Os materiais foram emblocados em parafina à temperatura ambiente.

Para a infiltração dos materiais em Paraplast seguiu-se os mesmos procedimentos descritos acima para inclusão em parafina.

Dois protocolos de inclusão com Polietilenoglicol 1.500 (PEG) foram avaliados.

No primeiro, os materiais foram lavados em álcool 70%, em seguida, transferidos para uma solução de PEG + álcool 70% (1:1) e deixados na estufa a 60° C por duas horas em frasco tampado. Posteriormente, o frasco foi aberto e permaneceu na estufa por 24 horas até que a água evaporasse. Os materiais então foram colocados em PEG puro e permaneceram na estufa, ainda a 60°C, por 24 horas. Em seguida, procedeu-se o emblocamento em PEG puro em freezer por 5 minutos.

No segundo protocolo, os materiais foram lavados em água destilada por 5 minutos e colocados em solução de água + PEG (3:1) na estufa a 60° C, por duas horas em frasco tampado. Em seguida foram colocados em solução de água + PEG (1:1) por 2 horas na estufa em frasco tampado. Então, o frasco foi aberto para que a água evaporasse e os materiais permaneceram na estufa aquecida por 12 horas. Posteriormente, trocou-se a solução por PEG puro e o frasco foi mantido por mais 12 horas na estufa. Em seguida, procedeu-se o emblocamento em PEG puro em freezer por 5 minutos.

Cortes de 20 µm foram obtidos dos materiais submetidos aos diferentes protocolos de infiltração, fixados em suporte metálico, cobertos com ouro e encaminhados à microscopia eletrônica de varredura.

4 Resultados

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE JOVENS E ADULTOS DE *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO (1934) (ARANEAE: SICARIIDAE), COM ÊNFASE NOS SEGMENTOS DO DUCTO E DA AMPOLA: UMA PERSPECTIVA EVOLUTIVA

Capítulo II

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA OBTENÇÃO DE CORTES DE ESTRUTURAS DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DA ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO 1934 (ARANEAE: SICARIIDAE) COM VISTAS À ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Capítulo I

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE
JOVENS E ADULTOS DE *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO (1934)
(ARANEAE: SICARIIDAE), COM ÊNFASE NOS SEGMENTOS DO DUCTO E
DA AMPOLA: UMA PERSPECTIVA EVOLUTIVA.**

ALINE MARGRAF¹; CRISTINA L. S. COSTA-AYUB¹; JOSÉ ROSA GOMES¹;
CLÁUDIA F. ORTOLANI-MACHADO²; MARIA ALBERTINA DE MIRANDA
SOARES^{1*}

1. Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa/PR, Brasil
2. Departamento de Biologia Celular. Universidade Federal de Curitiba/PR, Brasil

***Correspondência:** Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748 - Ponta Grossa/PR, Brasil CEP 84030-900. Telefone: (55)42 32203131. email: tina@uepg.br

RESUMO

Variações no sistema reprodutor masculino têm sido descritas para diferentes espécies de aranhas, principalmente sobre a morfologia dos espermatozoides e sua forma de transferência para o corpo da fêmea. O sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* é composto por dois testículos, cada um ligado ao *vas deferens* por duas estruturas, um ducto e uma ampola, ainda não descritas para outras espécies de aranhas. O presente trabalho teve como objetivo descrever a morfologia das estruturas reprodutivas masculinas, durante o desenvolvimento pós-embrionário de *L. intermedia*, a nível de microscopia de luz. Os animais selecionados foram anestesiados e sacrificados. Seus abdomens foram removidos e fixados em paraformaldeído 4%, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, e impregnação em historesina. Posteriormente, cortes seriados a 5 µm foram submetidos à coloração HE e reação PAS. Na sequência do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*, observou-se que as aranhas com quatro ecdises ainda possuem seus testículos imaturos, sem produção de *synspermia*. A ampola e o *vas deferens*, nestes animais, aparecem como um cordão de células sem luz visível. Na quinta ecdise, inicia a produção de *synspermium* no testículo e torna-se visível a abertura do lúmen da ampola e do *vas deferens*. Em períodos mais avançados do desenvolvimento, mas antes da sexta ecdise, os animais jovens já possuem *synspermia* no interior da ampola e do *vas deferens*, indicando que a quinta ecdise é o estágio fundamental para a diferenciação das estruturas do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*. A modificação dos palpos em pedipalpos, contendo bulbos copulatórios, é observada somente a partir da sexta ecdise. No entanto, os animais com cinco ecdises já possuem seus palpos muito perto do cefalotórax de forma semelhante à posição dos pedipalpos do macho adulto. O desenvolvimento do sistema reprodutor masculino da aranha marrom prioriza a maturação dos testículos. Após o aparecimento de *synspermium* dentro dos testículos, o desenvolvimento do ducto, ampola e *vas deferens* tem lugar e, finalmente, ocorre a modificação externa do palpos em órgãos copulatórios. O ducto é composto por um epitélio simples não secretor, sem luz definida. A função do ducto é, provavelmente, selecionar espermatozoides viáveis. A parede da ampola é composta por um epitélio secretor, cuja secreção glicoproteica envolve o *synspermia*. A secreção liberada pela ampola deve estar envolvida na funcionalidade dos gametas, como a manutenção de sua integridade, a nutrição, a transferência para o corpo da fêmea, e pode também estar relacionada aos mecanismos de seleção sexual, ainda não definidos para esta espécie de aranha. Estes aspectos, provavelmente, foram importantes para ampliar as estratégias evolutivas de reprodução em *L. intermedia*.

Palavras chave: *Loxosceles intermedia*, sistema reprodutor masculino, desenvolvimento, ducto e ampola.

Abstract

Variations on male reproductive system have been described for different spider species mainly concerning the sperm cells morphology and their transference manner for the female body. The adult male reproductive system of *L. intermedia* is composed by two testicles each one connected to the *vas deferens* two others structures, a duct and an *ampulla*, not yet described for other species of spiders. The present study aimed to describe the morphology of male reproductive structures, during post embryonic development of *L. intermedia* at light microscopy level. The selected animals were etherized and sacrificed. Their abdomens were removed and fixed in 4% paraformaldehyde/ 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and embedded in historesin (Leica). Subsequently, the serial 5 µm sections were submitted to HE staining and PAS reaction. Following the development of the male reproductive system of *L. intermedia* it was observed that spiders with four ecdysis still have immature testis, without *synspermia* production. The *ampulla* and the *vas deferens* in these animals appear as a string of cell without a visible lumen. In the fifth ecdysis, begins the production of *synspermium* in the testis and it is clear the opening of the lumen of the *ampulla* and *vas deferens*. In more advanced periods of the development, but before sixth ecdysis, young animals have already *synspermia* within *ampulla* and *vas deferens*, indicating that the fifth ecdysis is the key stage for differentiation of the structures of male reproductive system of *L. Intermedia*. A change of palps in pedipalps containing copulatory bulbs is only observed from the sixth ecdysis. However, animals with five ecdysis already show their palps very close to the cephalotorax similarly to the male adult pedipalps position. The development of the male reproductive system of the brown spider prioritizes the maturation of the testis. After appearance of *synspermium* inside the testicles, the development of the duct, *ampulla* and *vas deferens* take place, and finally the external modification of the palps in copulatory organs occurs. The tissue of the duct is composed of a simple non-secretory epithelium, without a defined lumen. The function of the duct is probably the selection of viable sperm cells. The *ampulla* wall is composed of a secretory epithelium whose glycoprotein secretion involves the *synspermia*. The secretion released by the *ampulla* should be involved in functionalities of the gametes like the maintenance of their integrity, nutrition, transference to the body of the female, and may also be related to mechanisms of sexual selection, not yet established for this species of spider. These aspects probably were important to enlarge the evolutionary strategies of reproduction in *L. intermedia*.

Keywords: *Loxosceles intermedia*, male reproductive system, development, ducto and *ampulla*.

1. Introdução

Variações do sistema reprodutor masculino têm sido descritas para diferentes espécies de aranhas, principalmente, no que diz respeito a morfologia dos espermatozoides e a forma de transferência dos mesmos para o corpo da fêmea (COSTA-AYUB, 2006; MICHALIK & HUBER, 2006; TALARICO *et al.*, 2008).

Os testículos de *Loxosceles intermedia* consistem de um longo par de corpos cilíndricos conectados, cada qual, a um extenso e espiralado *vas deferens* por meio de um fino ducto e uma volumosa ampola (COSTA-AYUB & FARACO, 2006).

Segundo Michalik (comunicação pessoal), as estruturas do ducto e da ampola não foram ainda descritas em outras espécies de aranhas e são, provavelmente, características espécie-específicas observadas, em *L. intermedia*, por Costa-Ayub e Faraco (2006). De acordo com Costa-Ayub e Faraco (2006), a forma de transferência dos espermatozoides em *L. intermedia* é o *synspermium*, conjunto de quatro espermatozoides envoltos por citoplasma e membrana plasmática comuns, e os epitélios do testículo, da ampola e do *vas deferens* produzem secreções glicoprotéicas que envolvem os gametas e possivelmente participam de diferentes aspectos funcionais da reprodução nesta espécie.

As peculiaridades encontradas no sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*, possivelmente, constituem uma estratégia evolutiva de reprodução para a adaptação da espécie.

A realização de estudos morfológicos funcionais baseados em análise de microscopia de luz e eletrônica, combinados com observações do comportamento de cópula, contribuem para o melhor entendimento das estruturas do sistema reprodutor em aranhas, bem como da sua evolução (EBERHARD, 1985, 1996, 2004a; EBERHARD *et al.*, 1993; Alberti, 1995; GALIS, 1996; HELLRIEGEL & WARD, 1998; UHL, 2002; ALBERTI & MICHALIK, 2004; HUBER, 2004a; MICHALIK *et al.*, 2005a. *Apud* BURGER *et al.*, 2006a).

Os objetivos deste trabalho foram: 1) descrever o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*; 2) investigar a morfologia do ducto e das secreções da ampola através de microscopia de luz e eletrônica de varredura; 3) discutir o papel destes segmentos na regulação da passagem e armazenamento do *synspermium* e em outros aspectos de sua funcionalidade; 4) apresentar suas possíveis implicações na estratégia evolutiva de reprodução dessa espécie.

2. Metodologia

Machos e fêmeas adultos de *L. intermedia* foram coletados em residências nas cidades de Ponta Grossa e Palmeira (25° 11' 16" S/50° 08' 40" O e 20° 24' 46" S/50° 00' 23" O, respectivamente), Paraná, Brasil. O dimorfismo sexual, baseado na análise dos palpos, serviu de parâmetro para diferenciação entre machos e fêmeas a partir da quinta ecdise. Estes animais foram acondicionados individualmente em potes plásticos, com o fornecimento mensal de água em

algodão umedecido e larvas de *Tenebrio molitor*, sendo acompanhados periodicamente para controle das ecdises.

Machos e fêmeas adultos mantidos em laboratório foram preparados para cópula, a fim de se obter animais em estágios iniciais de desenvolvimento. Após a eclosão, os animais foram individualizados em potes plásticos tendo recebido o mesmo tratamento supra descrito para os indivíduos adultos. Aranhas jovens na terceira, quarta, quinta e sexta ecdises foram selecionadas e, dentre essas, fez-se uma coleta aleatória de animais com ecdises precedentes à quinta devido à ausência de qualquer dimorfismo sexual nessas fases do desenvolvimento. Animais que realizaram a sexta ecdise foram colocados para copular, a fim de evidenciar a sua maturidade sexual.

Para a microscopia de luz, os machos adultos foram eterizados e dissecados para isolamento dos testículos, ducto e ampola, que foram fixados em paraformaldeído (PAF) 4% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.4, por 2 horas em temperatura ambiente. As estruturas foram desidratadas usando gradientes de etanol e embebidas em historesina. Cortes seriados foram obtidos com espessura de 5 μm e corados com Hematoxilina e Eosina ou submetidos a reação histoquímica do Ácido Periódico Schiff (PAS) para detecção de carboidratos neutros. A fotodocumentação foi realizada com o auxílio de câmera fotográfica digital, Sony 1080, acoplada a microscópio Nikon. Um total de 10 animais adultos foram utilizados nas análises.

Os animais jovens foram anestesiados com éter etílico, tendo seus abdômens fixados e submetidos às mesmas etapas para obtenção de lâminas histológicas, já descritas para os adultos. Em média foram utilizados 3 animais para cada etapa do desenvolvimento, em um total de 9 animais analisados.

Para microscopia eletrônica de varredura, os animais adultos selecionados foram eterizados, tiveram seus testículos, ductos e ampolas dissecados e fixados em glutaraldeído (GLUTA) 2.5%, paraformaldeído (PAF) 2% em tampão cacodilato (CACO) 0,2M, pH 7,4, por 2 horas em temperatura ambiente. Na sequência, os tecidos foram desidratados em gradientes de etanol e submetidos a ponto crítico (BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer). As estruturas foram fraturadas e transferidas para um suporte e submetidos à metalização (SCD 030 BALZERS UNION FLSL 9496 BALZERS). Um total de 20 animais adultos foram utilizados nas análises.

3. Resultados

Não se observou diferenciação na anatomia do sistema reprodutor nos animais sacrificados anteriormente a realização da quarta ecdise, portanto não foram utilizados nas análises.

3.2 Animais jovens com quatro ecdises

Os machos jovens com quatro ecdises apresentam fenda genital fechada e palpos indiferenciados com relação ao seu aspecto morfológico e posicionamento anatômico, não sendo possível ainda distinguí-los externamente das fêmeas

(Figuras 1c, c', c"). Os testículos, sem luz evidente, aparecem compostos pelo tecido germinativo (Figura 2a). Cada testículo é envolto por uma camada de células achatadas, as células mióides (Figura 2b). Células germinativas em processo de meiose e *synspermia* não foram observados. Os segmentos do ducto, da ampola e do *vas deferens* não apresentam diferenciação morfológica, e aparecem representados como um longo e estreito cordão de células que se estende do testículo até a fenda genital. Não foi visualizada nesta fase do desenvolvimento atividade secretora desempenhada pelos tecidos dos testículos, ampola e *vas deferens*.

3.3 Animais jovens com cinco ecdises

Para os animais na quinta ecdise, observou-se uma disposição diferencial dos palpos em alguns espécimens, similar a visualizada em machos adultos, o que levou a uma escolha precoce dos mesmos. Todos os animais machos jovens com cinco ecdises foram selecionados com base na posição anatômica dos palpos, uma vez que os mesmos encontravam-se ainda morfológicamente indiferenciados (Figuras 1 a, a', a").

Em animais que acabaram de sofrer a quinta ecdise, o testículo ainda não apresenta células do tecido germinativo em processo de espermatogênese (Figura 3a), sendo possível observar o início da formação do lúmen na ampola e no *vas deferens*, que já se encontram morfológicamente individualizados (Figuras 3 b-d). O ducto também se apresenta individualizado, mas sem lúmen (Figura 3a).

A fenda genital já se encontra aberta e o lúmen do canal ejaculatório está em processo de formação (Figura 3e).

Em animais mais adiantados do desenvolvimento, após a quinta ecdise, observam-se nos testículos células germinativas em processo de meiose e alguns espermatozóides já se apresentam compondo *synspermium* em sua luz, indicando o início da espermatogênese. Entretanto, pouca atividade secretora pode ser evidenciada (Figura 4a). O ducto apresenta-se ainda com células justapostas, sem um lúmen evidente (Figura 4b). A ampola encontra-se ainda em formação e suas células mostram-se pouco afastadas umas das outras (Figura 4c) e a porção final do *vas deferens* apresenta uma luz estreita (Figura 4d).

Em outros indivíduos, neste mesmo estágio do desenvolvimento, notou-se uma maior atividade nos testículos. Estes encontravam-se em ativa espermatogênese, apresentando um número maior de células germinativas em processo de meiose e diferenciação das espermátides. Notou-se evidentemente a luz deste segmento e uma grande quantidade de *synspermia* em seu interior, juntamente com o aumento da atividade secretora neste segmento (Figura 5a). O tecido do ducto apresentou uma única camada de células cilíndricas justapostas (Figura 5d). A luz da ampola encontra-se completamente aberta bem como a do *vas deferens*. A presença de *synspermia* acumulado no interior da ampola foi visualizada. Grande quantidade de *synspermia* é observado atravessando o *vas deferens*. Na porção da ampola, observou-se pouca atividade secretora, porém na região do *vas deferens* foi possível notar a presença de grande quantidade de secreção glicoproteica (Figuras 5b e c).

3.4 Animais jovens com seis ecdises

Os palpos dos machos com seis ecdises já se apresentavam diferenciados contendo bulbos copulatórios, sendo esses selecionados por esse critério (Figuras 1b, b',b"). Esses animais apresentaram comportamento de cópula de acordo com o descrito para o animal adulto (FISCHER, 1996), o que comprova a sua maturidade sexual. A avaliação morfológica para os animais nessa fase do desenvolvimento encontra-se ainda em andamento.

3.5 Machos adultos

Em machos adultos, um longo par de testículos, constituído de epitélio germinativo em ativo processo de espermatogênese, aparece conectado ao *vas deferens*, por meio de um ducto de tamanho variável e diâmetro aproximado de 41,5 µm e uma volumosa ampola (Figura 6). Nos testículos de todos os indivíduos adultos analisados, observou-se o tecido germinativo extremamente ativo na meiose indicando a ocorrência de espermatogênese, porém, foi observada uma pequena quantidade de *synspermia* acumulada em sua luz (Figura 7). O ducto é composto por células cilíndricas justapostas de aspecto compacto, mostrando-se sempre com sua luz colabada nas análises em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz (Figuras 8 a e b), quando não apresenta *synspermium* em seu interior. Um único *synspermium* foi observado passando através do fino ducto em preparados de microscopia de luz (Figura 9). As células deste segmento não apresentam características secretoras, sendo este resultado confirmado com a realização de testes histoquímicos.

A parede da ampola também mostra-se composta por um epitélio simples, composto por células poligonais com núcleo arredondado, secretor. Neste segmento, o *synspermia* se acumula, e compõem, juntamente com uma abundante secreção glicoproteica, o sêmen (Figura 10). Posteriormente, os *synspermia* seguem para o *vas deferens* e, finalmente, alcançam a fenda genital. Na ampola, aparentemente, a secreção mostra-se com aspecto granuloso (Figuras 11a, b).

4. Discussão

Estudos presentes na literatura a respeito do desenvolvimento do sistema reprodutor de aranhas são bastante raros. Portanto, o presente trabalho contribui com dados a respeito do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino da aranha marrom *L. intermedia*, os quais podem ser importantes para estudos comparativos futuros em outras espécies de aranhas.

O desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* segue uma seqüência de eventos, ocorrendo primeiramente a formação dos testículos, seguido pela diferenciação do ducto, ampola e *vas deferens* e finalizando com a observação da abertura da fenda genital e diferenciação dos palpos em órgãos copulatórios. Essa seqüência de desenvolvimento do sistema reprodutor masculino contempla estruturas mais internas em relação às mais externas. Da mesma forma, o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino de *L. intermedia* ocorre por meio de uma seqüência de eventos, iniciando-se pela formação das estruturas mais internas e finalizando com o surgimento das

estruturas mais externas, assim, inicia-se pela formação dos ovários, seguido pelo aparecimento dos ovócitos em vitelogênese e, posteriormente, observa-se a formação dos ductos dos ovidutos e *uterus internus* e, por último, das espermatecas (MARGRAF & COSTA-AYUB, 2006).

A maturação sexual em machos de *L. intermedia* parece ser precoce em relação a outras aranhas, uma vez que ela acontece em animais em fase juvenil, que precisam sofrer, no mínimo, mais uma ecdise antes de atingir a fase adulta (FISCHER, 1996). O período da última ecdise da fase juvenil (sexta ecdise) em *L. intermedia* é bastante variável, podendo levar dias, semanas e até meses para ocorrer. Assim a passagem para a fase adulta em *L. intermedia* não pode ser estabelecida previamente devido à grande assincronia no desenvolvimento desses organismos. Diferentemente, em *Pholcus phalangioides*, aranha haplógena da família Pholcidae, o desenvolvimento pós-embriônico é bem mais sincrônico, podendo ser estabelecido o tempo das ecdises para que esse organismo atinja a fase adulta (MICHALIK & UHL, 2005). No presente trabalho, demonstrou-se que a maturidade sexual em machos de *L. intermedia* começa a ser estabelecida já na quinta ecdise, quando várias etapas do processo de espermatogênese e atividade secretora já são visualizadas no interior do testículo, ainda que a diferenciação do palpo em órgão copulatório, segundo Fisher, (1996), ocorra somente à partir da sexta ecdise. A atividade secretora também é evidenciada no *vas deferens* e na ampola em indivíduos com cinco ecdises. Outro aspecto importante da genitália externa evidenciada no presente trabalho foi a posição anatômica arqueada para baixo e em direção ao abdomen dos palpos, característica dos machos adultos,

em animais que não sofreram a sexta ecdise, indicando que essa estrutura inicia a sua modificação concomitantemente ao início do processo de espermatogênese nos testículos. A espermatogênese em *L. intermedia* é também contínua no adulto, uma vez que se observa células em meiose e na espermiogênese no tecido testicular, o que está de acordo com o descrito na literatura para espécies que apresentam um tempo longo de vida adulta e copula várias vezes (MICHALIK & UHL, 2005). No adulto, há ainda uma maior atividade secretora dos testículos, dos *vas deferens* e da ampola. A secreção presente no *vas deferens* e, provavelmente, no testículo e ampola, estão envolvidas com a formação de uma cápsula protéica em torno de cada *synspermium* (COSTA-AYUB & FARACO, 2006).

A única descrição do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino em aranhas mostra que o processo de espermatogênese em *P. phalangioides* tem início apenas algumas semanas antes da ecdise que precede a formação do adulto, portanto, a sua maturidade sexual é mais tardia quando comparada à *L. intermedia* (MICHALIK & UHL, 2005). Apesar da maturidade sexual em machos de *L. intermedia* ser atingida em um período juvenil mais precoce que de *P. phalangioides*, a sua passagem para adulto, conforme descrito por Fischer (1996), é tardia em relação a essa espécie de aranha.

Há ainda a necessidade de mais esclarecimentos se a presença de estruturas especializadas no sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*, nunca descritas para outras espécies de aranha, contribuem de forma significativa para a eficiência do seu processo reprodutivo, fazem com que essa espécie necessite

de um tempo maior (indeterminável) para atingir a fase adulta. Assim, provavelmente, o organismo despende muito tempo e energia para garantir o sucesso reprodutivo a partir do desenvolvimento gradual de estruturas peculiares.

Muito embora estes estudos sobre aspectos morfológicos do desenvolvimento do sistema reprodutor de aranhas sejam escassos na literatura, os mesmos contribuem para novas inferências filogenéticas e/ou taxonômicas e/ou evolutivas desse grupo de organismos.

As descrições da literatura, em geral, para machos de aranhas adultas, apontam para a conexão dos testículos diretamente ao *vasa deferentia*, que é um par de túbulos alongados e contorcidos estendendo-se longitudinalmente na região posterior do corpo (SIMEÓ *et al.*, 2009). Em *L. intermedia*, os testículos se conectam ao *vasa deferentia* por meio de duas estruturas, um fino ducto e uma ampola volumosa, as quais são aqui descritas pela primeira vez para aranhas. Essa peculiaridade do sistema reprodutor de *L. intermedia* pode ter implicações filogenéticas e/ou taxonômicas e/ou evolutivas.

A diversidade morfológica dos espermatozóides em aranhas fundamentada em estudos de ultraestrutura e de seus distintos modos de transferência para o corpo da fêmea têm sido um caráter usado na definição de táxon desde o século XIX e, mais recentemente, no estabelecimento de relações filogenéticas desse grupo de organismos (MICHALIK *et al.*, 2004a; MICHALIK *et al.*, 2005a; MICHALIK *et al.*, 2006; MICHALIK & HUBER, 2006). Outros caracteres, como a morfologia externa e, mais recentemente, aspectos moleculares também têm sido

utilizados no estabelecimento de relações filogenéticas em aranhas (MICHALIK *et al.*, 2006). Com relação à morfologia interna das aranhas, principalmente, concernente a peculiaridades de seu sistema reprodutor, são raros os relatos na literatura que a considera no estabelecimento de relações filogenéticas e/ou taxonômicas e/ou evolutivas.

Com relação ao provável papel dessas estruturas descritas para *L. intermedia*, pode-se considerar que o ducto seleciona os espermatozóides aptos por meio de controle da entrada e saída dos mesmos através de seu lúmen, o qual se abre e fecha muito rapidamente, e permite apenas a passagem de um *syspermium* de cada vez. Prova disso é que somente em um evento, durante toda realização dos experimentos, observou-se no lúmen do ducto a presença de um *syspermium*. Previamente a esta descrição, há relato de uma única observação de um *syspermium* no interior do ducto (Costa-Ayub, comunicação pessoal). Ainda, a membrana do *syspermium* faz um contato estreito com as células que compõem o ducto, o que sugere que mecanismos de reconhecimento celular devem estar envolvidos no processo de seleção. O fato de o *syspermia* ser acumulado na ampola e não no testículo, pode reforçar o importante papel do ducto na seleção dos gametas, uma vez que, só será acumulado aquele *syspermium* que passou por um crivo e foi aprovado. Por outro lado, as células da ampola produzem uma abundante secreção glicoprotéica que envolve cada *syspermium* e o acompanha por todo o trajeto no *vas deferens*, que pode estar relacionada ao seu armazenamento no interior do sistema genital do macho e a diversos aspectos de sua funcionalidade. A secreção da ampola, aparentemente,

é mais granulosa que da região distal do *vas deferens* (COSTA-AYUB, 2006). Portanto, o ducto atuaria na seleção do *synspermium* funcional e o encaminharia para o armazenamento na ampola, onde seria envolto por secreção somente aquele capaz de fecundar, evitando que a energia gasta no processo de produção dos mesmos no testículo, seleção pelo ducto, e produção de secreção pela ampola, durante a cópula fosse desperdiçada com células defeituosas, fazendo com que este animal tivesse o seu sucesso reprodutivo comprometido. A proteção da integridade dos espermatozóides faz-se necessária para garantir o armazenamento dos mesmos tanto no sistema copulatório do macho como durante a sua transferência e estocagem na espermateca da fêmea, sendo que as secreções produzidas pelo sistema genital do macho tem importante papel nesse aspecto (MICHALIK *et al.*, 2004a; MICHALIK & UHL, 2005; TALARICO *et al.*, 2008). A secreção produzida e liberada por estruturas do sistema reprodutor dos machos pode também estar envolvida com a nutrição e ativação dos mesmos no sistema reprodutor da fêmea (MICHALIK & UHL, 2005; BURGER *et al.*, 2006a).

Outro aspecto que não se pode deixar de considerar ao evidenciar o surgimento de novas estruturas no sistema reprodutor de aranhas é o papel na evolução da reprodução desse grupo de organismos, a partir da discussão da sua provável vantagem seletiva.

Segundo Eberhard & Cordero (1995), não se pode deixar de considerar o papel da seleção sexual na origem de variações na morfologia genital de uma espécie. Evidências dessa afirmação podem ser vistas em Masta & Maddison

(2002) cujos estudos demonstraram que a diversificação da genitália de populações de *Habronattus pugillis*, da família Salticidae, é resultante do processo de seleção sexual. Os machos são fenotipicamente distintos nas diferentes populações, enquanto as fêmeas não mostram diversificação morfológica externa, evidenciando a ocorrência de seleção sexual unidirecional nesta espécie de aranha.

Variações morfológicas que parecem estar relacionadas com processo de seleção sexual são objetos de estudos em diferentes espécies de aranhas. Em fêmeas poligâmicas, em geral, a escolha de espermatozóides de um determinado macho pode estar relacionada à morfologia das espermatecas. As espermatecas de *L. intermedia* são do tipo “fundo de saco”, descrita por Margraf e Costa-Ayub (2006), característico das aranhas haplóginas (UHL, 1994a,b; 2000a), determinando que os últimos espermatozóides a serem depositados sejam os primeiros a serem liberados, estabelecendo a prioridade do último macho a copular (BURGER *et al.* 2006a; UHL, 2000a). Entretanto, outros mecanismos de seleção sexual podem estar atuando, de maneira que a morfologia do receptáculo das fêmeas poligâmicas possa não ser o único fator determinante da prioridade dos espermatozóides (UHL, 2000a). Um outro mecanismo de seleção sexual pode ser devido às secreções produzidas e liberadas por estruturas do sistema reprodutor masculino de aranhas que, ao constituir um bloqueio à entrada de outros espermatozóides, determina um processo de competição entre os machos (HUBER, 2005). No receptáculo das fêmeas de *Silhouettella loricatula*, espécie de aranha haplógina da família Oonopidae, são encontrados espermatozóides de

cada macho envolvidos por uma capa de secreção, sendo que a fêmea pode ejetar pacotes de gametas de determinados machos durante a cópula, evidenciando-se assim um outro processo de seleção sexual (BURGER *et al.*, 2006b).

Em *L. Intermedia*, a transferência dos espermatozóides do corpo do macho para a fêmea ocorre na forma de *synspermia*, que constitui uma grande massa de espermatozóides (COSTA-AYUB & FARACO, 2006). Para machos de *Indicoblemma lannaianum*, espécie de aranha haplógina pertencente a família Tetrablemmidae, somente uma pequena quantidade de espermatozóides é produzida e transferida no momento da cópula, o que indica a ocorrência de pouca ou nenhuma competição dentro da fêmea (BURGER, *et al.*, 2006a). Esses dados sugerem que em *L. intermedia* exista alguma competição entre espermatozóides de cada macho dentro do corpo da fêmea, uma vez que as mesmas são poligâmicas e copulam algumas vezes antes da ovoposição. Assim, a grande quantidade de espermatozóides depositados por um macho no interior do corpo da fêmea de *L. intermedia* pode garantir o sucesso reprodutivo deste indivíduo e promover a prevalência de suas informações genéticas, constituindo-se assim em um mecanismo de seleção sexual. Ainda, a presença de estruturas como o ducto e a ampola, como caracteres divergentes em *L. intermedia*, além de poderem servir para reforçar o controle de qualidade e funcionalidade dos espermatozóides, podem permitir a seleção sexual por estabelecer mecanismos de prioridade de machos. Se não há competição de espermatozóides em *I. lannaianum*, o sucesso reprodutivo do primeiro macho a copular já está, de certa

forma, garantido, não havendo a necessidade de gastar energia na manutenção de estruturas que possam estar envolvidas com mecanismos de seleção sexual. Para *L. intermedia*, o sucesso reprodutivo de um determinado macho parece ser alcançado porque, além de uma grande quantidade de *synspermia* que pode ser depositada no corpo da fêmea contendo a maioria dos espermatozóides devem estar aptos para fertilização, outros mecanismos de seleção sexual podem estar atuando devido a morfologia peculiar do sistema reprodutor masculino desta espécie. Em *P. Phalangioides*, a energia é gasta durante a cópula, uma vez que os machos movimentam seus palpos de maneira que os espermatozóides depositados anteriormente por outros machos sejam expelidos, determinando assim um outro processo de seleção sexual (UHL, 2000a).

Em machos de *P. Phalangioides*, diferentes tipos de secreção são produzidas pelo *vas deferens*, testículos e órgão copulatório, potencialmente, apresentando distintas funções (MICHALIK & UHL, 2005). Em *L. intermedia*, similarmente ao que ocorre em *P. phalangioides*, diferentes tipos de secreções são produzidas pelos testículos, *vas deferens* e ampola, as quais, certamente, desempenham distintas funções no processo reprodutivo dessa espécie.

Estudos realizados em outras espécies de animais confirmam o exposto acima, como por exemplo, em *Drosophila melanogaster* (Diptera), onde alguns componentes do fluido seminal têm efeitos severos no sucesso reprodutivo de machos e fêmeas: as proteínas e peptídeos do fluido seminal podem diminuir a receptividade das fêmeas, aumentar a produção de ovos, auxiliar na estocagem

dos espermatozóides, além de serem necessários para a transferência e competição dos espermatozóides (GILLOTT, 2003).

Morfológicamente, as secreções observadas nos testículos e *vas deferens* de *L. intermedia* são distintas das descritas para outras espécies (KLAN *et al.*, 2005; MICHALIK *et al.*, 2005a; MICHALIK & UHL, 2005; MICHALIK & HUBER, 2006) e, conjuntamente com a secreção da ampola, caracterizam uma divergência na composição do fluido seminal, que pode estar atuando em mecanismos de seleção sexual baseados no estabelecimento da prioridade de espermatozóides. Diferenças entre tipos de secreções no sistema reprodutor masculino foram observadas para outras espécies de aranhas (MICHALIK *et al.*, 2005b), evidenciando especificidades na reprodução desse grupo.

Os dados acima demonstram que é complexo o processo de reprodução de aranhas e que as divergências encontradas nas estruturas que compõem o sistema reprodutor de espécies distintas, no caso de *L. intermedia*, a presença de estruturas como o ducto e a ampola, bem como as secreções produzidas, tanto nas fêmeas como nos machos, desempenham distintos papéis, evidenciando uma forte pressão para que novos mecanismos de seleção sexual atuem a fim de garantir o sucesso reprodutivo desses organismos. Assim, examinar a morfologia do sistema genital de aranhas em profundidade auxilia na compreensão de sua funcionalidade, o que, em conjunto com estudos sobre o seu comportamento de acasalamento, dentre outros, acabam por estabelecer um conhecimento mais detalhado sobre a complexidade dos sistemas reprodutivos de aranhas e de seu papel na seleção sexual e evolução do grupo (BURGER *et al.*, 2006a). Este tipo

de estudo pode contribuir para a elaboração de estratégias de controle

desta espécie de aranha que, no estado do Paraná (região dos Campos Gerais), é considerada endêmica.

O presente estudo contribui com dados sobre o desenvolvimento e descrição morfológica do sistema genital masculino de *L. intermedia* que são de extrema relevância para a compreensão das estratégias evolutivas de reprodução dessa espécie. Entretanto, estudos sobre a composição e função das secreções de machos e fêmeas fazem-se necessários para se estabelecer a contribuição precisa de cada sexo nesse processo. Do mesmo modo, o processo de reconhecimento de gametas que parece ocorrer no ducto pode constituir-se em uma estratégia evolutiva divergente que permitiria a essa espécie ter um melhor controle na produção de seus espermatozoides, garantindo a sua viabilidade ao atingir o sistema reprodutor feminino. Entretanto, estudos mais aprofundados sobre a biologia molecular da interação entre o *synspermium* e as células dos ductos devem ser realizados a fim de avaliar melhor essa hipótese.

FIGURAS

Figura 1. Posição e morfologia dos palpos de *Loxosceles intermedia*. **a.** Vista dorsal do cefalotórax de um animal com cinco ecdises. As setas indicam os palpos, que neste estágio de desenvolvimento não apresentam bulbos copulatórios. **a'.** Vista lateral da porção anterior do cefalotórax. A seta indica um palpo, que já apresenta sua posição anatômica arqueada para baixo e em direção ao abdômen característica dos machos adultos. **a''.** Vista frontal da porção anterior do cefalotórax. As setas indicam os palpos sem a presença dos bulbos copulatórios. **b.** Vista dorsal do cefalotórax de um macho com seis ecdises. A seta indica os palpos diferenciados em bulbos copulatórios. **b'.** Vista lateral da porção anterior do cefalotórax. A seta indica os palpos com os bulbos copulatórios com sua posição anatômica arqueada para baixo e em direção ao abdômen característica dos machos adultos. **b''.** Detalhe dos bulbos copulatórios presentes nos palpos diferenciados de um macho adulto. **c.** Vista dorsal da porção anterior do cefalotórax de uma fêmea adulta. A seta indica os palpos que não apresentam bulbos copulatórios. **c'.** Vista lateral da porção anterior do cefalotórax. As setas indicam os palpos. **c''.** Vista frontal da porção anterior do cefalotórax. As setas indicam os palpos em posição anatômica característica das fêmeas.

Figura 2. Corte longitudinal do abdomen de macho de *Loxosceles intermedia* com quatro ecdises. Microscopia de luz e coloração H.E. **a.** O testículo está disposto longitudinalmente ao plano do corte, não sendo possível evidenciar seu lúmen. Aumento 100X (+Zoom 2.0). **b.** Porção do testículo, mostrando as células mióides de formato achatado (seta branca) Nenhuma atividade espermatogênica nas células germinativas foi observada. Aumento de 400X (+Zoom 2.0). **T** – testículos.

Figura 3. Cortes longitudinais de testículos de machos de *Loxosceles intermedia* que acabaram de sofrer a quinta ecdise. Microscopia de luz e coloração H.E. Imagens **a**, **b**, **d** e **e** com aumento de 400X (+Zoom 2.0) e imagem **c** com aumento de 100X (+Zoom 2.0). Neste estágio de desenvolvimento o ducto, a ampola e o *vas deferens* não apresentam a típica conformação de um cordão de células, encontrada em indivíduos com quatro mudas, sendo possível observar o início da formação de um lúmen. **a.** O testículo ainda não apresenta atividade de espermatogênese e parte da porção distal que irá compor o ducto é vista a partir da porção proximal do testículo; **b.** Nota-se a porção proximal do testículo e um cordão de células em corte transversal que irá compor a região distal da ampola. As células que compõem a ampola aparecem se distanciando umas das outras. **c.** O *vas deferens* também aparece em processo de abertura de seu lúmen. **d.** Detalhe do processo de formação do lúmen no *vas deferens*. **e.** Porção da fenda genital, onde pode-se notar o canal ejaculatório em processo de abertura para formação de seu lúmen. A fenda genital já aparece aberta. **A** – ampola; **CE** – canal ejaculatório; **D** – ducto; **FG** – fenda genital; **T** – testículo; **VD** – *vas deferens*.

Figura 4. Corte longitudinal do abdomen de macho de *Loxosceles intermedia* em estágio mais adiantado do desenvolvimento, após a quinta ecdise. Microscopia de luz e coloração H.E. **a.** O testículo apresenta luz evidente e células em processo de espermatogênese, notando-se atividade meiótica nas células germinativas (seta branca). Percebe-se a presença de secreção neste segmento (símbolo *). Aumento 100X (+ Zoom 2.0). **b.** Porção distal do testículo unido à porção proximal do ducto, esta estrutura notadamente encontra-se com suas células justapostas, sem evidência de lúmen. Aumento 400X (+Zoom 2.0). **c.** Porção da ampola com células que parecem ter se afastado umas das outras para delimitar um lúmen, portanto, nota-se uma pequena abertura em seu interior. Aumento 400X (+Zoom 2.0). **d.** Porção do *vas deferens* com suas células compondo um cordão delimitando um lúmen estreito, porém, assim como nas células que compõem a ampola, elas parecem ter se afastado umas das outras para delimitarem uma luz. **A** – ampola; **D** – ducto; **T** – testículo; **VD** – *vas deferens*.

Figura 5. Corte longitudinal de abdomen de macho de *Loxosceles intermedia* em estágio mais adiantado da quinta ecdise. Microscopia de luz e reação de PAS. **a.** Porção do testículo, onde nota-se o aumento da atividade espermatogênica nas células germinativas, podendo-se visualizar maior número de células em processo de meiose próximas ao lúmen deste órgão. Aumento 100X (+ Zoom 2.0). **b.** Porção da ampola, onde as células que compõem este segmento produzem uma secreção glicoprotéica. Nota-se no interior deste segmento uma massa de *synspermia* envolta pela secreção. Aumento 400X (+ Zoom 2.0). **c.** Na porção do *vas deferens* as células que o compõem delimitam um lúmen que aparece estreito, porém, repleto de secreção glicoprotéica (símbolo *). **d.** Aumento 400x (+Zoom 2.0). Porção proximal do testículo conectado a porção distal do ducto. O ducto possui epitélio tipo simples composto por células cilíndricas justapostas. Aumento 100X (+ Zoom 2.0). **A** – ampola; **D** – ducto; **T** – testículo; **VD** – *vas deferens*.

Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura dos segmentos do testículo, ducto e ampola de macho de *Loxosceles intermedia*. O testículo é conectado à uma volumosa ampola por um ducto que possui diâmetro aproximado de 41.5 μm (seta branca). **A** – ampola; **T** – testículo.

Figura 7. Corte longitudinal do abdomen de macho adulto de *Loxosceles intermedia*, coloração H. E. Aumento de 400x (+Zoom 2.0). O testículo apresenta tecido germinativo extremamente ativo na meiose e espermatogênese, porém pouca quantidade de *synspermium* é acumulada em sua luz (seta vazada). As cabeças de seta apontam *synspermium* se direcionando para a luz do testículo; à direita, notadamente, observa-se quatro *synspermium* na porção proximal do testículo próximo a entrada do ducto.

Figura 8. Segmento do ducto de macho de *Loxosceles intermedia*. As células que o compõem não possuem características secretoras e este sempre aparece com sua luz colabada tanto em MEV como em microscopia de luz. **a.** Microscopia Eletrônica de Varredura do segmento do ducto. **b.** Corte transversal do ducto. Microscopia de luz e coloração H.E. Aumento 400X (+Zoom 2.0).

Figura 9. Corte transversal do ducto de macho *Loxosceles intermedia*. Microscopia de luz e coloração H.E. Nota-se a presença de um *synspermium* atravessando o ducto (cabeça de seta). As células que compõem o ducto estão afastadas umas das outras, delimitando um lúmen, e a membrana do *synspermium* faz um contato estreito com as células desse segmento (seta branca). Aumento 400X (+Zoom 2.0).

Figura 10. Corte longitudinal do segmento da ampola de macho adulto de *Loxosceles intermedia*. Microscopia de luz e coloração H.E. **a.** Lúmen da ampola preenchido por *synspermia*. A seta vazada aponta para uma das células que compõem o epitélio da ampola. **b.** O símbolo * indica a secreção glicoprotéica lançada pelas células da ampola. Aumento 400X (+Zoom 2.0).

Figura 11 **a.** Vista transversal da ampola de macho de *Loxosceles intermedia* em MEV. As setas brancas indicam alguns dos muitos *synspermium* que compõem a *synspermia* no interior da ampola. **b.** Detalhe mostrando a secreção granulosa produzida pelas células da ampola (cabeças de seta brancas). As setas brancas indicam alguns *synspermium* em meio à secreção.

FIGURA 1.

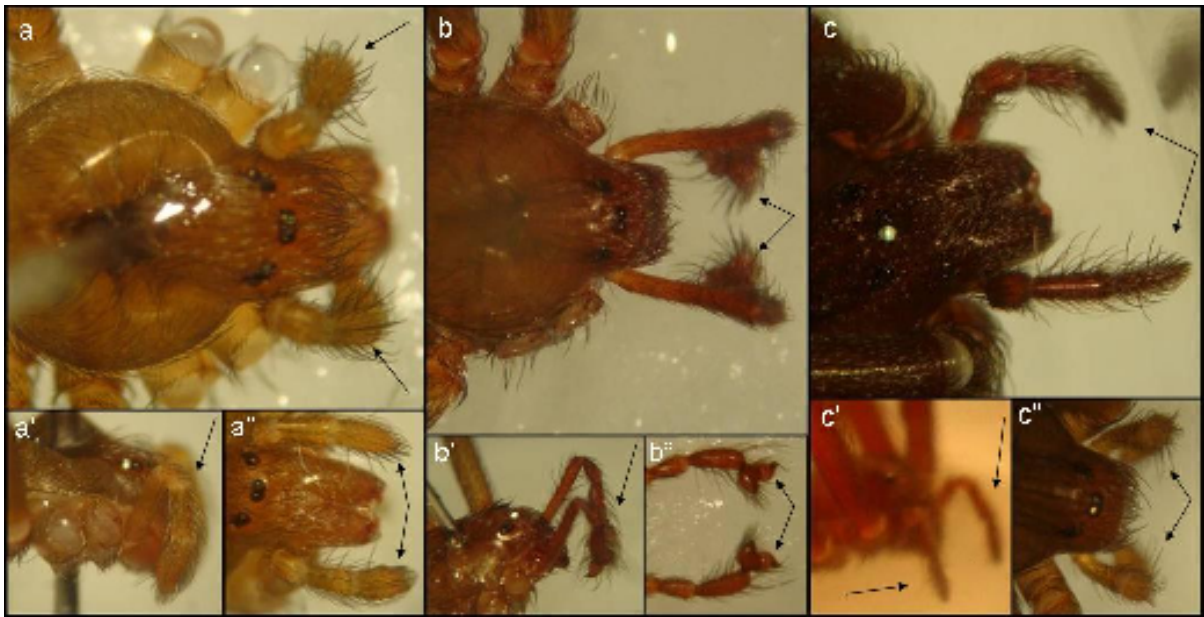


FIGURA 2.

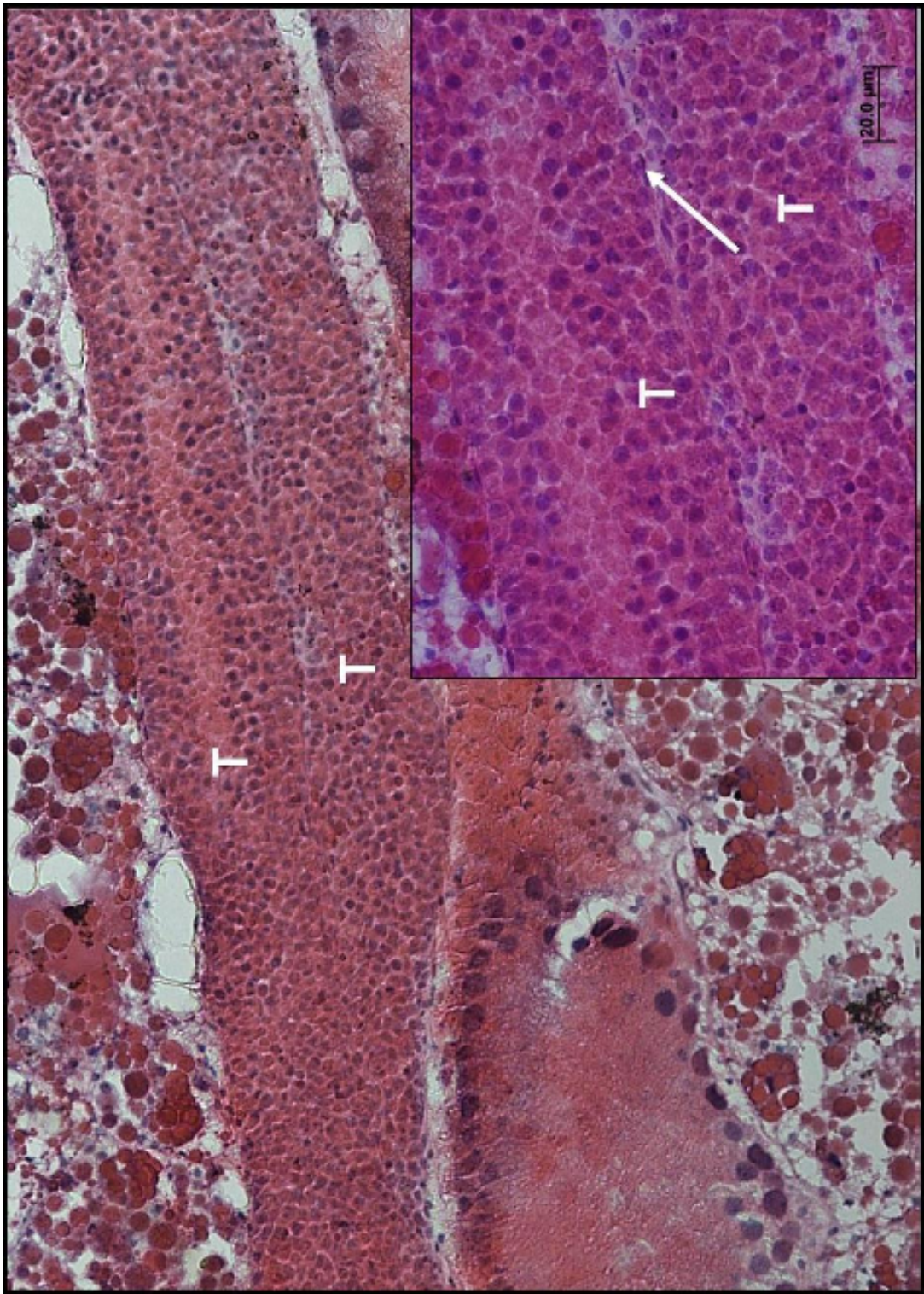


FIGURA 3.

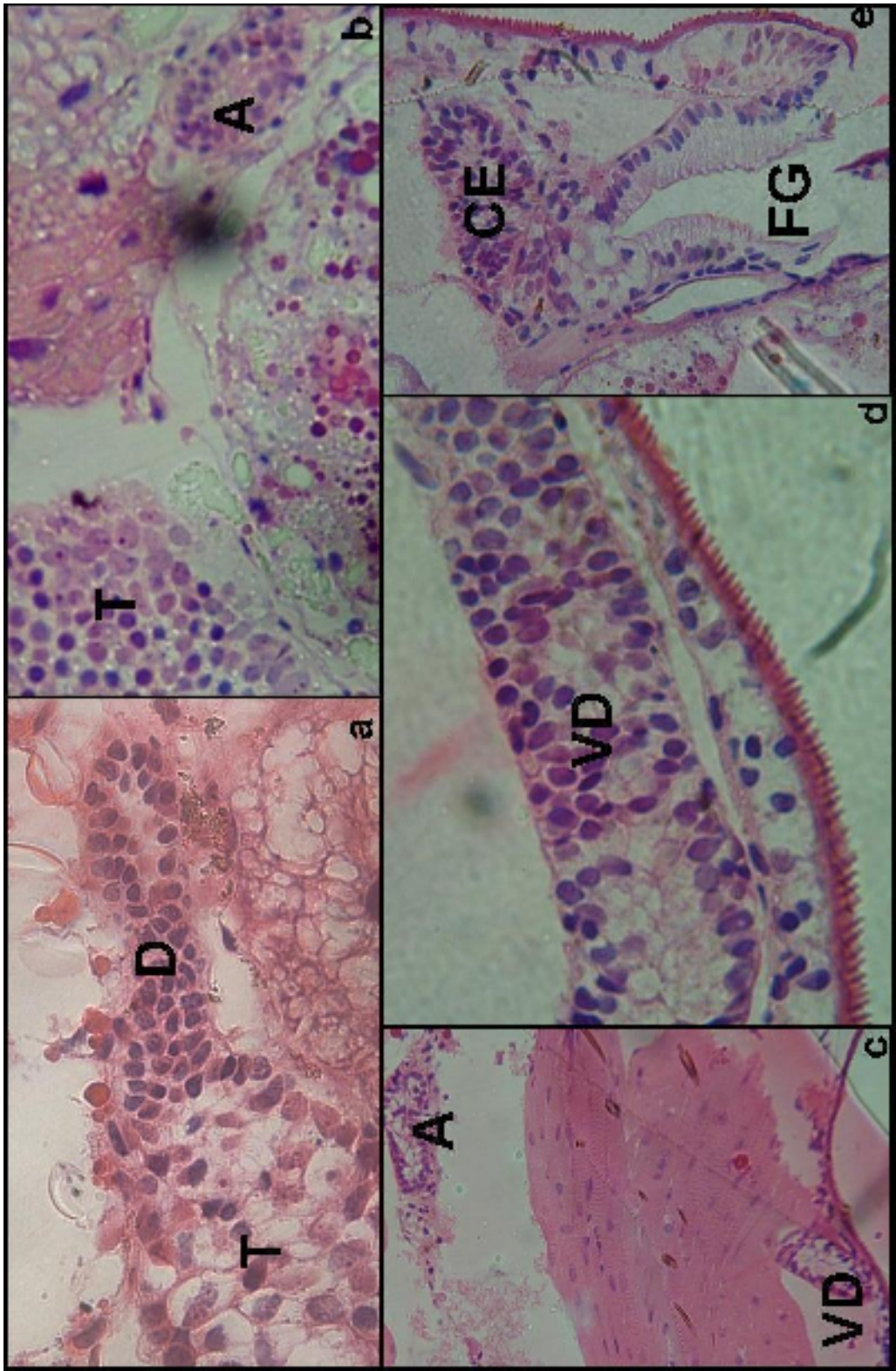


FIGURA 4.

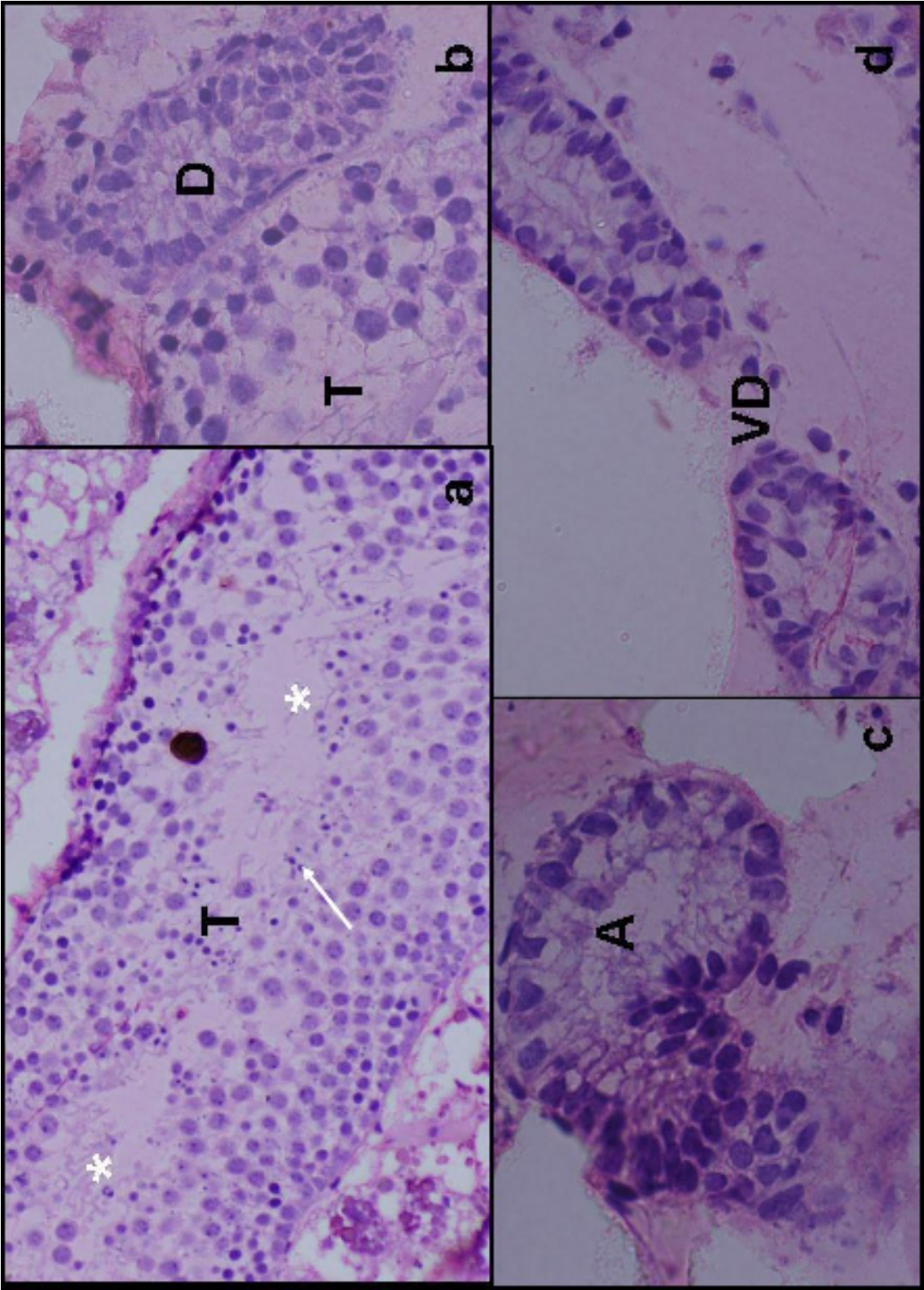


FIGURA 5.

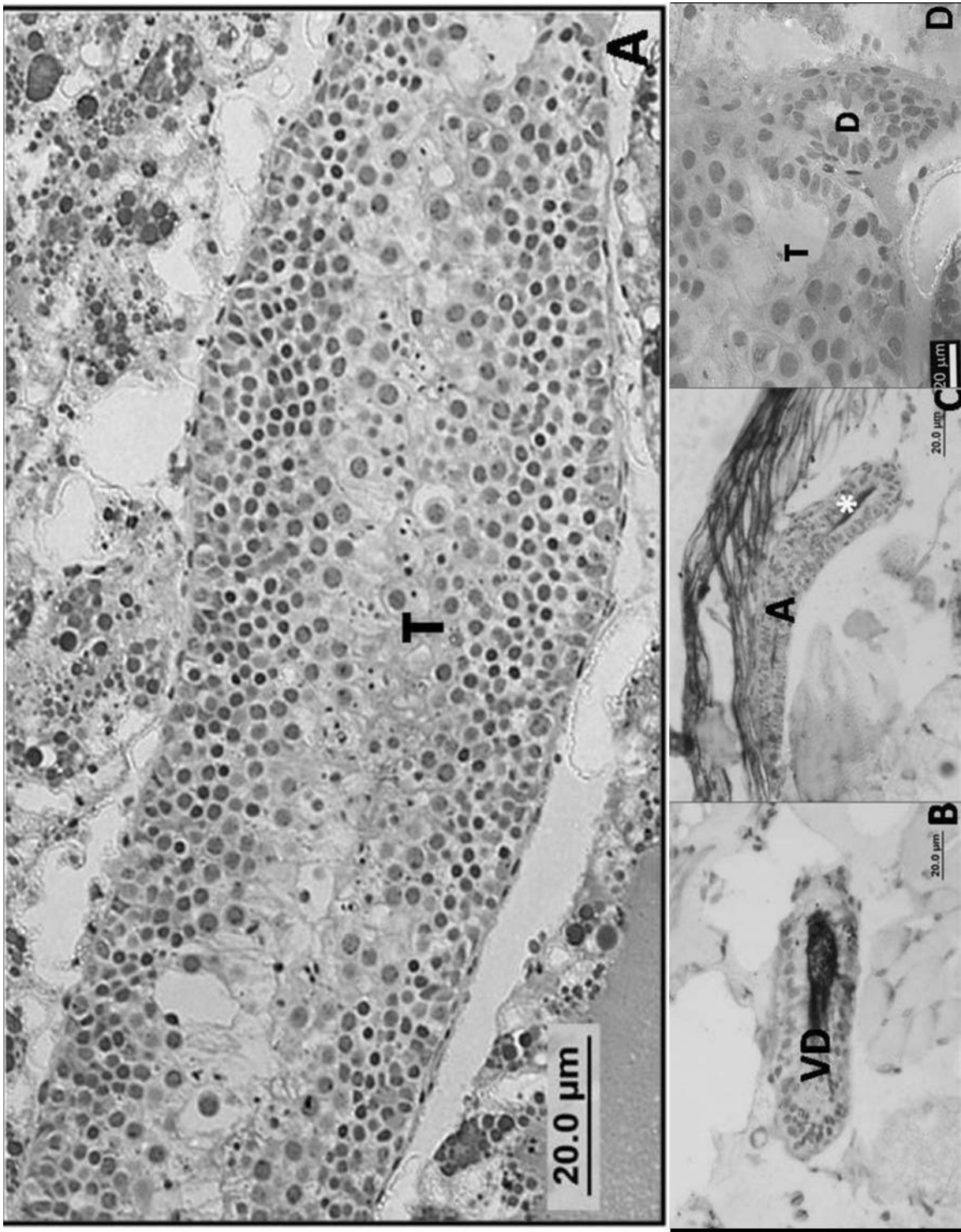


FIGURA 6.

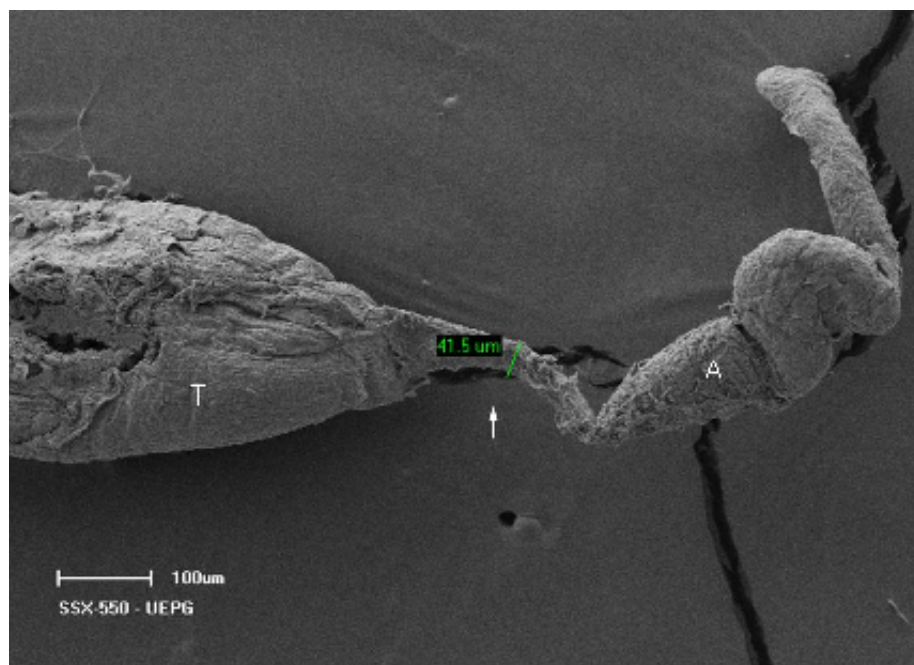


FIGURA 7.

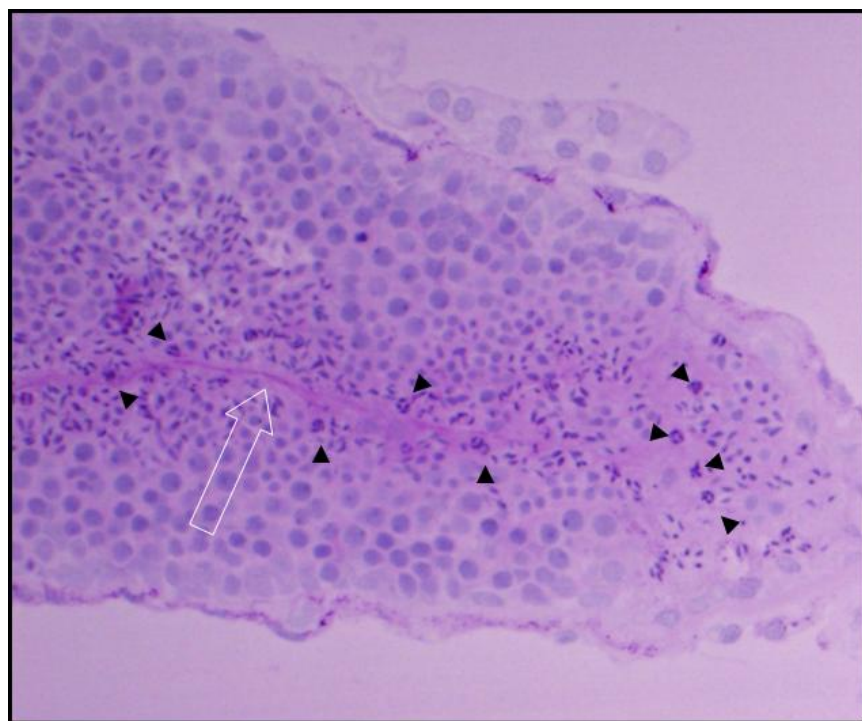


FIGURA 8.

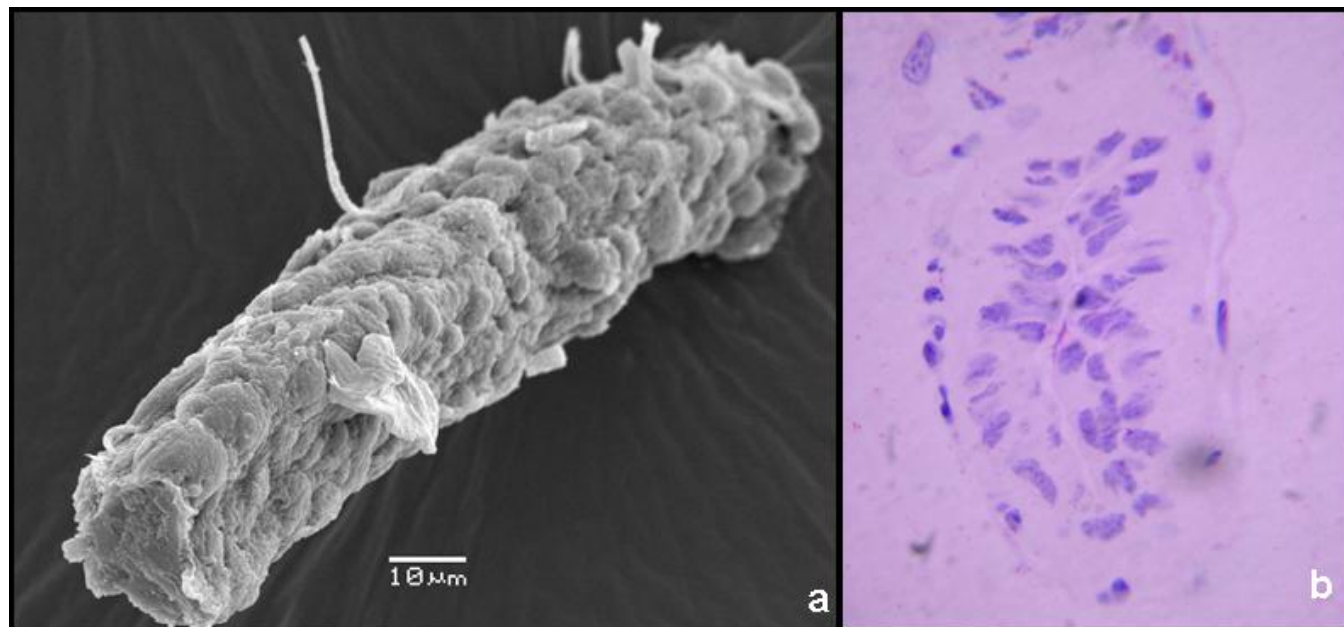


FIGURA 9.

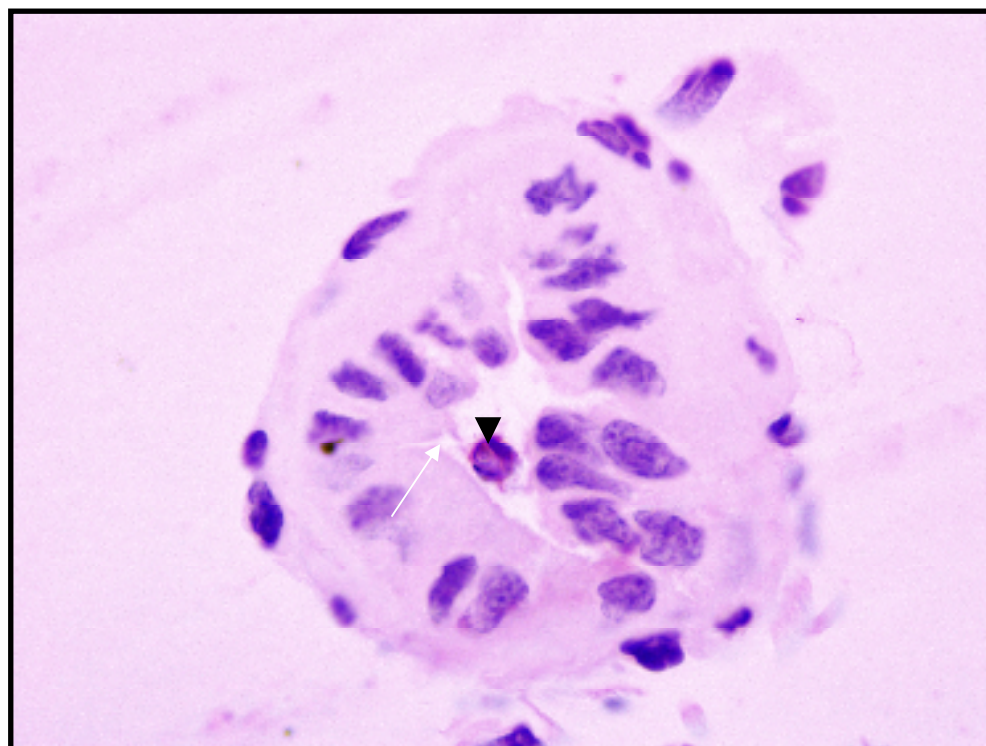


FIGURA 10.

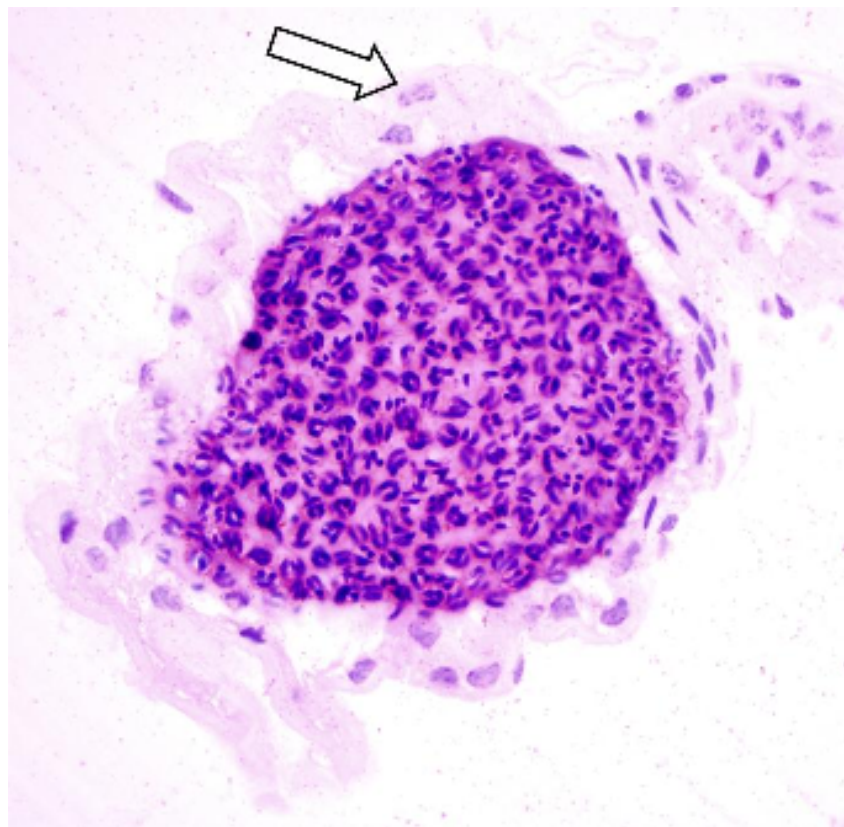
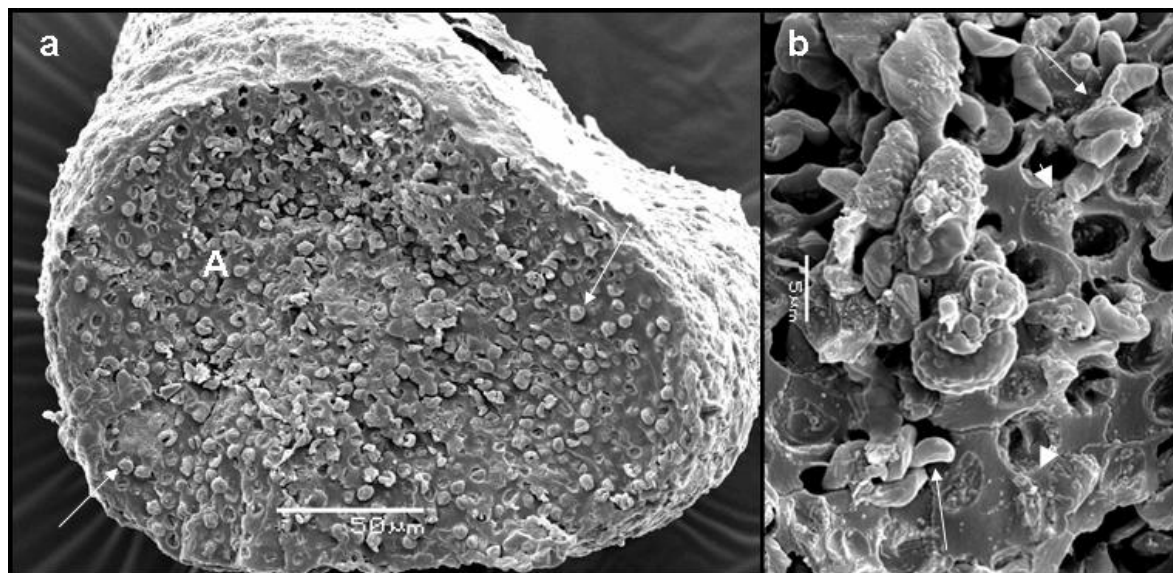


FIGURA 11.



Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Capítulo II

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA
OBTENÇÃO DE CORTES DE ESTRUTURAS DO SISTEMA REPRODUTOR
MASCULINO DA ARANHA MARROM *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO
1934 (ARANEAE: SICARIIDAE) COM VISTAS À ANÁLISE EM MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

ALINE MARGRAF¹; CRISTINA L. S. COSTA-AYUB¹; JOSÉ ROSA GOMES ¹;
CLÁUDIA F. ORTOLANI-MACHADO²; MARIA ALBERTINA DE MIRANDA
SOARES^{1*}

3. Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa/PR, Brasil
4. Departamento de Biologia Celular. Universidade Federal de Curitiba/PR, Brasil

***Correspondência:** Avenida General Carlos Cavalcanti, 4748 - Ponta Grossa/PR, Brasil CEP 84030-900. Telefone: (55)42 32203131. email: tina@uepg.br

Resumo

A aranha marrom é uma espécie venenosa, predominante em Curitiba e cidades vizinhas, no estado do Paraná (Brasil). É amplamente distribuída no ambiente doméstico, o que explica a alta incidência de loxoscelismo nessa região e o grande interesse na pesquisa dedicado a sua reprodução, especialmente ao nível morfológico. Considerando-se o fato de que os órgãos do sistema reprodutor masculino da *L. intermedia* são pequenos e frágeis, o que torna difícil a sua dissecação para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) pelos métodos usuais, esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar protocolos, utilizando parafina, paraplast ou polietileno glicol 1500 (PEG) (por tempo curto e longo de infiltração) como meio de infiltração, para a obtenção de cortes seriados para análise de estruturas biológicas destes órgãos em MEV. Quatro protocolos de infiltração foram avaliados, bem como três substâncias de adesão às lamínulas (albumina 5,5%, gelatina 0,1%, gelatina 1%). Os machos adultos foram dissecados e o conjunto testículos-ducto-ampola foi fixado em cacodilato de sódio 0,2 M, glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%, pH 7,4. Posteriormente, as estruturas foram submetidas aos protocolos distintos de infiltração e microtomia. Cortes seriados a 20 µm foram colocados em lâminas de vidro, lavados com xilol (solvente de parafina e paraplast e água para PEG), secados em condições ambientais e recobertos por ouro para análise em MEV. A eficiência dos quatro diferentes protocolos foi avaliada com base em parâmetros distintos relacionados ao processamento do material, bem como a preservação das características teciduais, sendo verificados através da análise das imagens dos preparados para MEV. O material incluído em parafina, tornou-se muito frágil e não foi possível realizar cortes dos tecidos. No material infiltrado em paraplast e montados em lâminas revestidas com albumina 5,5% não foi possível distinguir claramente as superfícies das células da parede da ampola, nem as do ducto, devido a má preservação das estruturas teciduais. Após a infiltração com PEG durante um período prolongado e aderência com gelatina 1%, as células do topo do testículo apresentaram suas membranas celulares com aparência irregular. Infiltração com PEG por um tempo curto e aderência com gelatina 1% foi o melhor protocolo resultando na manutenção da forma celular e as características teciduais. Conclui-se que, é possível obter cortes das estruturas reprodutivas, bem como de outros tecidos pequenos e frágeis da aranha marrom *L. intermedia* (e provavelmente de outras espécies de invertebrados), utilizando os protocolos acima, a fim de alcançar uma análise morfológica de alta qualidade por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Palavras-chave: aranha-marrom, infiltração, *Loxosceles intermedia*, sistema reprodutor masculino, microscopia eletrônica de varredura.

Abstract

The Brown spider is a venomous species, predominant in Curitiba and neighborhood cities in the state of Paraná (Brazil). It is abnormally widespread in domestic habitats, which explains the high incidence of loxoscelism in this region and the great interest in research dedicated to its reproduction, especially at morphological level. Considering the fact that the organs of the male reproductive system of the *L. intermedia* are tiny and fragile, which makes them difficult to dissect for observation in scanning electron microscopy (SEM) by the usual methods, this work was done with the objective to evaluate protocols, using paraffin, paraplast or polyethylene glycol 1500 (PEG) (for short and long time of infiltration) as infiltration medium, for obtaining serial sections for analysis of biological structures of these organs at SEM. Four protocols of infiltration were evaluated, as well as three adherence substances to slides (5.5% albumin, 0.1% gelatin, 1% gelatin). Adult males were dissected and their whole testis-duct-ampulla was fixed in 0.2 M sodium cacodilate, 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde, pH 7.4. Afterwards, the structures were submitted to the distinct protocols of infiltration and microtomy. 20 µm sections were placed on glass slides, washed with solvent (Xylene for paraffin and paraplast and water for PEG), dried at room conditions and gold coated for analysis in SEM. The efficiency of the four different protocols was evaluated on the basis of distinct parameters concerning the processing of the material, as well as the preservation of tissue characteristics, which was verified by analyzing images of the preparations in SEM. The material embedded in paraffin became very fragile and no tissue sections were obtained. In the material embedded in paraplast and mounted on slides coated with 5.5% albumin it was not possible to clearly distinguish the surfaces of cells in the wall of the *ampulla*, nor those of the duct, due bad preservation of the tissue structure. After infiltration with PEG over a prolonged period and adhesion with 1% gelatin, the cells of the top of the testicle show membranes with irregular appearance. Infiltration with PEG for a short time and adhesion with 1% gelatin was found to be the best protocol resulting in the maintenance of the cell shape and tissue characteristics. In conclusion, it is possible to obtain sections of the reproductive structures as well as of other small and fragile tissues of the brown spider of *L. intermedia* (and probably of other species of invertebrates), using the protocols above, in order to achieve accurate morphological analysis by scanning electron microscopy.

Keywords: brown spider, infiltration, *Loxosceles intermedia*, male reproductive system, scanning electron microscopy.

1. Introdução

A aranha marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) tem sido foco de estudos recentes devido ao crescimento dos acidentes causados por sua picada, conhecidos como loxocelismo, que se tornou um problema de saúde pública no Estado do Paraná, onde essa espécie é a predominante (COSTA-AYUB, 2006; FISCHER 2002).

Os estudos sobre aspectos morfológicos do sistema reprodutor de *L. Intermedia* em nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão foram realizados por Costa-Ayub e Faraco (2006). Para a realização dos estudos morfológicos utilizando microscopia eletrônica de transmissão, foi necessária a padronização de um protocolo de fixação dos tecidos baseado na osmolalidade da hemolinfa dessa espécie (COSTA-AYUB *et al.*, 2006). Entretanto, trabalhos complementares utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) são necessários para um melhor entendimento da biologia reprodutiva da aranha marrom e para dar subsídios a estudos futuros que visem estabelecer estratégias de controle do crescimento populacional dessa espécie.

Segundo Caetano (2007), dados obtidos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitem compreender melhor a anato-fisiologia de um sistema. Além disso, muitas respostas sobre comportamentos exibidos por animais foram dadas graças a conhecimentos gerados por estudos anatomo-fisiológicos obtidos através de técnicas de MEV.

Assim, estudos utilizando MEV parecem ser promissores na identificação de características morfológicas peculiares das estruturas do sistema reprodutor de *L. intermedia*, permitindo desta forma fazer inferências a respeito de sua funcionalidade e/ou comportamento reprodutivo dessa espécie.

O grande desafio que enfrentamos ao trabalhar com aranhas, é o fato de que as estruturas do seu aparelho reprodutor são pequenas e de consistência bastante delicada, o que acaba comprometendo o manuseio do material e, portanto, a qualidade das preparações para análises em MEV. Diante dessas dificuldades, o estabelecimento de metodologias que permitam uma maior precisão na manipulação desse material biológico poderá propiciar a identificação de estruturas de interesse, resultando numa análise morfológica de alta qualidade.

A grande maioria das técnicas já descritas para análise em MEV permite a visualização da morfologia externa de estruturas pequenas e íntegras ou partes de órgãos ou esfregaços de células que passaram por processo de fixação, ponto crítico e metalização. Entretanto, essas técnicas não são eficientes quando as estruturas biológicas a serem analisadas são bastante delicadas e muito pequenas, como é o caso daquelas do aparato genital masculino de *L. intermedia*.

A eficiência das análises em MEV poderia ser melhorada se o material biológico pudesse ser seccionado, o que proporcionaria uma melhor identificação e caracterização das estruturas de interesse. Esse modo de trabalho é rotineiro em preparações para a microscopia de luz, onde a obtenção dos cortes dos

tecidos é realizada após a impregnação do material com algum meio de sustentação, denominado material de inclusão, que mantém as células e as estruturas intercelulares unidas e firmes. Entretanto, não há trabalhos na literatura a respeito de protocolos para obtenção de cortes para análise em MEV.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes protocolos para a obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. Intermedia* para a análise em MEV, de maneira a obter uma técnica que aliasse a manutenção das características teciduais com a praticidade do procedimento a ser realizado.

2. Material e Métodos

Um total de 20 machos adultos foram utilizados no presente trabalho, sendo os testículos, ductos e ampolas de 5 aranhas utilizados em cada protocolo avaliado no presente trabalho (Tabela I).

A Figura 1 mostra uma ilustração das etapas do procedimento metodológico utilizado no presente trabalho.

Cada macho foi selecionado baseado em sua morfologia externa, ou seja, com base na observação de um palpo modificado em órgão copulatório (pedipalpo). Os animais foram anestesiados com éter etílico, dissecados conjunto testículo-ducto-ampola e fixados em glutaraldeído (GLUTA) 2,5% e paraformaldeído (PAF) 2%, em tampão cacodilato (CACO) 0,2M, pH 7.4. Após fixação dos tecidos por 3h a 4°C, os materiais foram lavados 3X por 5 minutos,

em tampão CACO 0,2M, e submetidos aos quatro diferentes protocolos de impregnação em diferentes meios de inclusão para obtenção de cortes para análise em microscopia eletrônica de varredura (Tabela I).

Posteriormente, cortes de 20 μ m foram obtidos e o conjunto testículo + ducto + ampola foi fixado à lamínula e lavado com solvente ou água para remoção do material de inclusão e, em seguida, aderido ao suporte para observação em MEV. Como consta na Tabela I, os meios de adesão dos cortes à lamínula avaliados foram: albumina 5,5%, gelatina 0,1%, e gelatina 1%. O preparo da albumina seguiu os padrões de rotina do laboratório de técnicas histológicas da UEPG, utilizando-se como estoque solução albumina:glicerina (1:1). Na sequência, procedeu-se a metalização (SCD 030 BALZERS UNION FLSL 9496 BALZERS) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

As análises dos dados foram realizadas com base na comparação entre as imagens obtidas em MEV dos materiais submetidos aos diferentes protocolos de infiltração (MEV JEOL JSM-6360LV, na UFPR). Buscou-se avaliar a preservação geral dos tecidos, aspectos superficiais das células, bem como a consistência das secreções. Ainda, levou-se em consideração nas análises da eficiência dos protocolos avaliados, o tempo de processamento, a fragilidade do material, a toxicidade para o manipulador dos reagentes utilizados, grau de praticidade da técnica, remoção do material de inclusão, bem como a melhor substância de aderência dos cortes às lamínulas.

3. Resultados

A Tabela II contém os dados sobre a avaliação da eficiência dos diferentes protocolos de infiltração para obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* com vistas às análises em MEV.

Os protocolos que utilizaram parafina ou paraplast como meio de infiltração do material biológico apresentaram os menores tempos de processamento (Tabela I). No que se refere à parafina, os outros parâmetros avaliados nesse protocolo não foram eficientes, uma vez que ao colocar as estruturas em xilol observou-se uma visível retração do tecido, assim como ao proceder a infiltração, ou seja, ao colocá-las em parafina a 60°C, notou-se uma desidratação acentuada das mesmas, resultando em um material bastante frágil, o que dificultou o seu manuseio. Consequentemente, a fragilidade do material impossibilitou a realização da microtomia e demais etapas subsequentes. Além disso, o uso do xilol faz essa técnica apresentar um alto grau de toxicidade (Tabela II). Resultados similares foram obtidos com o protocolo que utilizou o paraplast como meio de inclusão. As estruturas biológicas também se tornaram mais quebradiças após banhos em xilol e demais etapas de infiltração, dificultando o seu manuseio. Este protocolo de infiltração também possui alto grau de toxicidade devido ao uso de xilol, apesar desse solvente ter sido capaz de remover a maior parte do paraplast do material biológico. Entretanto, foi possível cortar esse material e albumina 5,5% foi satisfatória para adesão dos cortes às lamínulas (Tabela II). Com relação à preservação das características teciduais, não foi possível distinguir a maioria das estruturas celulares em grande parte do corte histológico,

o qual continha as porções proximal e distal dos tecidos da ampola e ducto, respectivamente (Figura 2A).

Ao efetuar o protocolo 1 de infiltração com PEG (Tabela I), notou-se que devido ao grande tempo de exposição do material ao produto em alta temperatura, aproximadamente 50 horas, houve retração e aumento da fragilidade do tecido, porém isso não comprometeu o seu manuseio durante todo o processamento. O fato de não haver necessidade de passar os tecidos pelo xilol, diminui a toxicidade da técnica, e, mesmo utilizando-se água destilada na etapa de remoção do meio de infiltração, o processo foi adequado. A substância de aderência dos cortes às lamínulas de melhor eficiência foi a gelatina 1% (Tabela II). A análise da região proximal do testículo em MEV evidenciou uma estrutura tecidual parcialmente preservada, com alguma alteração na morfologia das células, notadamente as membranas celulares mostraram-se irregulares, não sendo possível distinguir a presença de *synspermium* (conjunto de quatro espermatozóides compartilhando citoplasma e membranas plasmática) dentre as demais células da linhagem germinativa (Figura 2B).

No protocolo 2 de infiltração com PEG (Tabela I), o tempo de exposição do material ao produto a altas temperaturas foi reduzido em cerca de 22 horas, o que resultou em, visualmente, não se observar alterações estruturais significativas dos tecidos. Portanto, o manuseio do material durante todo procedimento não foi comprometido. Esta técnica apresenta baixa toxicidade, o que confere maior praticidade ao procedimento, e a remoção do material de infiltração, realizada em água destilada, foi satisfatória. A substância de aderência dos cortes às lamínulas

de melhor eficiência foi também gelatina 1% (Tabela II). As análises de preparações de porções do testículo em MEV mostraram que a estrutura tecidual apresentava-se totalmente preservada, com as superfícies celulares tendo aspecto íntegro e regular, sendo possível distinguir o *synspermium* das demais células da linhagem germinativa (Figura 2C).

4. Discussão

Em geral, o preparo de material biológico (estruturas pequenas e íntegras ou fraturadas e esfregaço de células) para avaliação em MEV envolve dissecção, fixação, desidratação e passagem por ponto crítico. Posteriormente, o material é colocado sobre lamínula contendo substância de aderência e orientado sobre suporte metálico. O conjunto é passado por processo de metalização previamente à observação em MEV.

A grande dificuldade em se trabalhar com tecidos de invertebrados, mais especificamente com tecidos da aranha marrom, é o pequeno tamanho dos seus órgãos e a presença de grande quantidade de musculatura apoiando-os à parede interna do abdomen (comunicação pessoal Costa-Ayub).

Tentativas prévias, utilizando os protocolos usuais de MEV, mostraram-se inadequadas para uma descrição morfológica mais detalhada de estruturas íntegras e/ou fraturadas do sistema reprodutor masculino da aranha marrom *L. intermedia* (Dados não publicados).

Com a finalidade de contornar esse problema, buscou-se avaliar técnicas, as quais são comumente utilizadas para análises em microscopia de luz, que permitissem obter cortes de estruturas do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* que pudessem ser analisados em MEV. Na avaliação dos diferentes protocolos para a obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*, procurou-se obter uma técnica que aliasse a manutenção das características teciduais com a praticidade do procedimento a ser realizado com vistas a possibilitar uma análise rápida de estruturas biológicas pequenas e frágeis em MEV. Testes com quatro protocolos diferentes utilizando meios de infiltração distintos (parafina, paraplast e PEG 1500) e distintas substâncias de aderência dos cortes à lamínula (albumina 5,5%, gelatina 0,1%, e gelatina 1%) foram realizados e a eficiência de cada um deles foi avaliada com base no tempo de processamento do material, nas alterações ocorridas no tecido durante o procedimento que poderiam comprometer seu manuseio, na toxicidade das substâncias utilizadas, na remoção do material de infiltração, na aderência dos cortes à lamínula e, por último, nas análises da preservação das características teciduais em MEV.

Em trabalhos realizados anteriormente, o uso de parafina como meio de infiltração de tecidos da aranha marrom *L. intermedia* mostrou-se inadequado (Dados não publicados). Esse dado foi confirmado no presente trabalho, uma vez que a passagem dos tecidos (testículo, ducto e ampola) primeiramente em xilol levou a uma visível retração do mesmo e a um aumento da sua fragilidade. Posteriormente, ao proceder a inclusão em parafina, observou-se uma

desidratação acentuada do tecido, resultando em um material bastante quebradiço e de difícil manuseio. A passagem pelo xilol parece comprometer a integridade dos tecidos e impedir a infiltração pela parafina, impossibilitando a continuidade do procedimento. Com o uso do paraplast, os efeitos do xilol foram semelhantes e a infiltração parece ter sido parcial, mostrando também um resultado não satisfatório. Além desse solvente ser inadequado para o preparo dos tecidos para a infiltração com parafina e paraplast, muito embora o mesmo mostre alguma eficiência, posteriormente, na remoção do material de inclusão, seu uso também é maléfico ao usuário devido a sua toxicidade.

O xilol é um composto volátil que quando ingerido pode ser bastante prejudicial à saúde ou até fatal e também pode causar severas irritações quando em contato com a pele, olhos e trato respiratório. Sua inalação causa irritação ao nariz e garganta e em altas concentrações pode causar náusea, vômito, dores de cabeça, severas dificuldades de respiração, dores e tosse. O seu vapor, em alta concentração, é anestésico e pode afetar o sistema nervoso central (MORAES, 2005; LANGMAN, 1994).

Em geral, é utilizada historesina como meio de infiltração nas preparações de cortes histológicos de tecidos de aranha para avaliação em microscopia de luz, uma vez que essa apresenta ótima penetração e é à base de água, dispensando o uso de xilol. No entanto, uma vez polimerizada, é difícil dissolver o bloco desse material, o que o torna inviável para o preparo de tecidos para observação em MEV. Outra opção avaliada neste trabalho foi o uso do PEG 1500 como meio de

infiltração dos tecidos, o qual é rotineiramente utilizado nas análises histológicas em vegetais (KRAUS & ARDUIM, 1997).

O PEG pertence a um grupo de polímeros com diferentes pesos moleculares (200-4000) e pontos de fusão. Esse polímero é miscível em água e muitos solventes orgânicos, é inerte e não dissolve glicogênio e muitos lipídeos celulares (HAYAT, 2000; COUTINHO *et al.*, 2003). Esse polímero tem sido utilizado como um meio de infiltração de tecidos para análises em microscopia de luz há anos, apresentando uma boa preservação da estrutura tecidual. Particularmente, o uso desse polímero em histoquímica e imunohistoquímica é excelente, uma vez que a sensibilidade da detecção de antígenos é bastante aumentada (GAO & GODKIN, 1991; SOFFIATTI & ANGYALOSSY, 2007).

A fácil remoção do polietilenoglicol dos tecidos com água torna esse polímero um meio propício para o uso em MEV, uma vez que o material biológico a ser analisado precisa estar completamente limpo e desidratado, a fim de permitir a identificação e a descrição morfológica detalhada das estruturas de interesse.

No decorrer dos dois protocolos avaliados utilizando-se o PEG 1500 como meio de inclusão notou-se que, a despeito do maior tempo de processamento, houve uma maior praticidade em efetuá-los, visto que poucos passos foram necessários para se concluir os procedimentos, principalmente no protocolo de infiltração com PEG onde diminuiu-se o tempo de processamento. Esse meio apresentou excelente infiltração e preservou melhor a estrutura geral dos tecidos

e das membranas celulares, possibilitando análises morfológicas mais precisas em MEV. Com o uso desse material de inclusão, foi possível distinguir das demais células no interior do testículo, um *synspermium*, devido à ótima preservação dos contornos celulares.

Entretanto, a aderência dos cortes de polietilenoglicol nas lamínulas é baixa, o que requer a utilização de substâncias de aderência.

No presente trabalho, algumas substâncias de aderência de cortes às lamínulas rotineiramente utilizadas em análises histológicas foram avaliadas. A gelatina 1% foi a substância de aderência mais eficiente em ambos protocolos que utilizaram PEG 1500 como meio de infiltração dos tecidos.

Conclui-se que PEG 1500, aliado ao uso da gelatina 1% como substância de aderência dos cortes às lamínulas, pode ser empregado como meio de infiltração na obtenção de cortes de estruturas do sistema reprodutor da aranha marrom *L. intermedia* e, provavelmente, para outros tecidos pequenos e frágeis dessa espécie e de outros invertebrados, com a finalidade de realizar análises morfológicas de alta qualidade em MEV.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação ilustrativa dos passos do procedimento metodológico básico utilizado neste trabalho para preparação de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *Loxosceles intermedia* a ser analisados em MEV. **A.** Vista ventral, por transparência, do posicionamento dos órgãos do sistema reprodutor masculino de um adulto da aranha marrom *L. intermedia* (A – ampola; D – ducto; EC – canal ejaculatório; EF – fenda genital; L - pulmão; T- testículos; VASA - *vas deferens*). **B.** Conjunto dissecado contendo o testículo, o ducto e a ampola submetido à fixação e desidratação. **C.** Estruturas após o emblocamento. **D.** Corte histológico a 20 μ m do bloco contendo as estruturas. **E.** Fixação do corte na lamínula contendo substância de aderência. **F.** Remoção da substância de emblocamento com auxílio de solvente ou água destilada. **G.** Fixação da lamínula sobre o suporte metálico de MEV com auxílio de fita dupla face. **H.** Metalização do conjunto: suporte + lamínula + material cortado. **I.** Conjunto metalizado.

Figura 2. Análise da morfologia de estruturas do sistema reprodutor masculino da aranha marrom *L. intermedia* submetidas a diferentes protocolos de infiltração em MEV. **A.** Infiltração em paraplast e adesão do corte à lamínula recoberta com albumina (5,5%). Não é possível distinguir com clareza as superfícies das células da parede da ampola, tampouco aquelas do ducto, devido à péssima preservação das características teciduais. A seta branca indica um aglomerado celular, porém, devido à má qualidade da preservação, torna-se impossível analisá-lo. A seta vazada indica ampla região do material onde é impossível distinguir qualquer estrutura celular. **B.** Infiltração em PEG (protocolo 1) e adesão do corte à lamínula recoberta com gelatina 1%. Observa-se alteração das membranas celulares na região proximal do testículo, as quais apresentam aspecto irregular (seta branca). **C.** Infiltração em PEG (protocolo 2) e adesão do corte à lamínula recoberta com gelatina 1%. Observa-se um agrupamento celular do testículo de aparência normal (seta vazada) e um *synspermium* (seta branca).

Tabela I. Protocolos avaliados para a obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* com vistas à análise em microscopia eletrônica de varredura.

Tabela II. Dados da avaliação da eficiência dos diferentes protocolos de infiltração visando a obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* com vistas à análise MEV.

Figura 1.

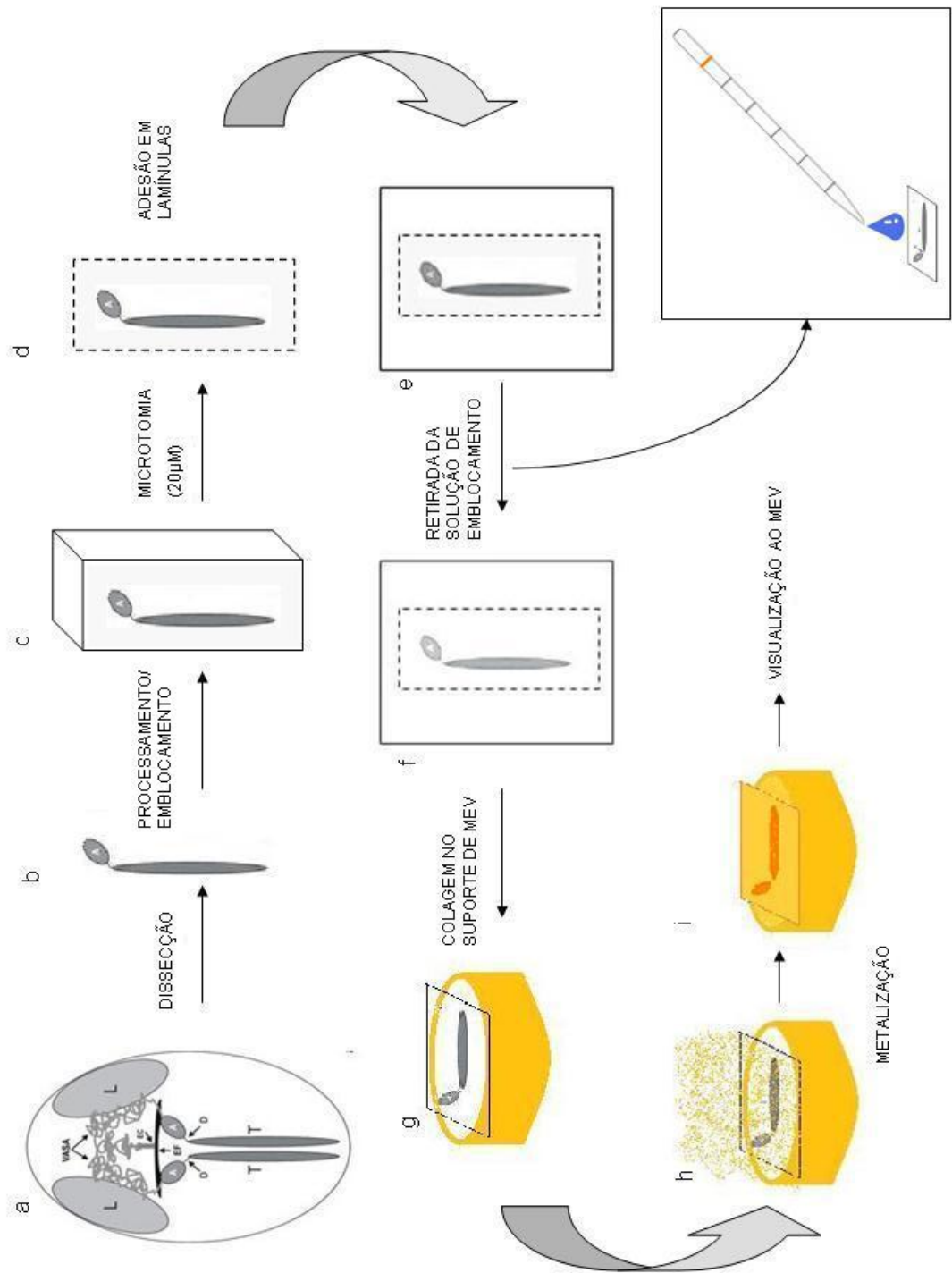


Figura 2.

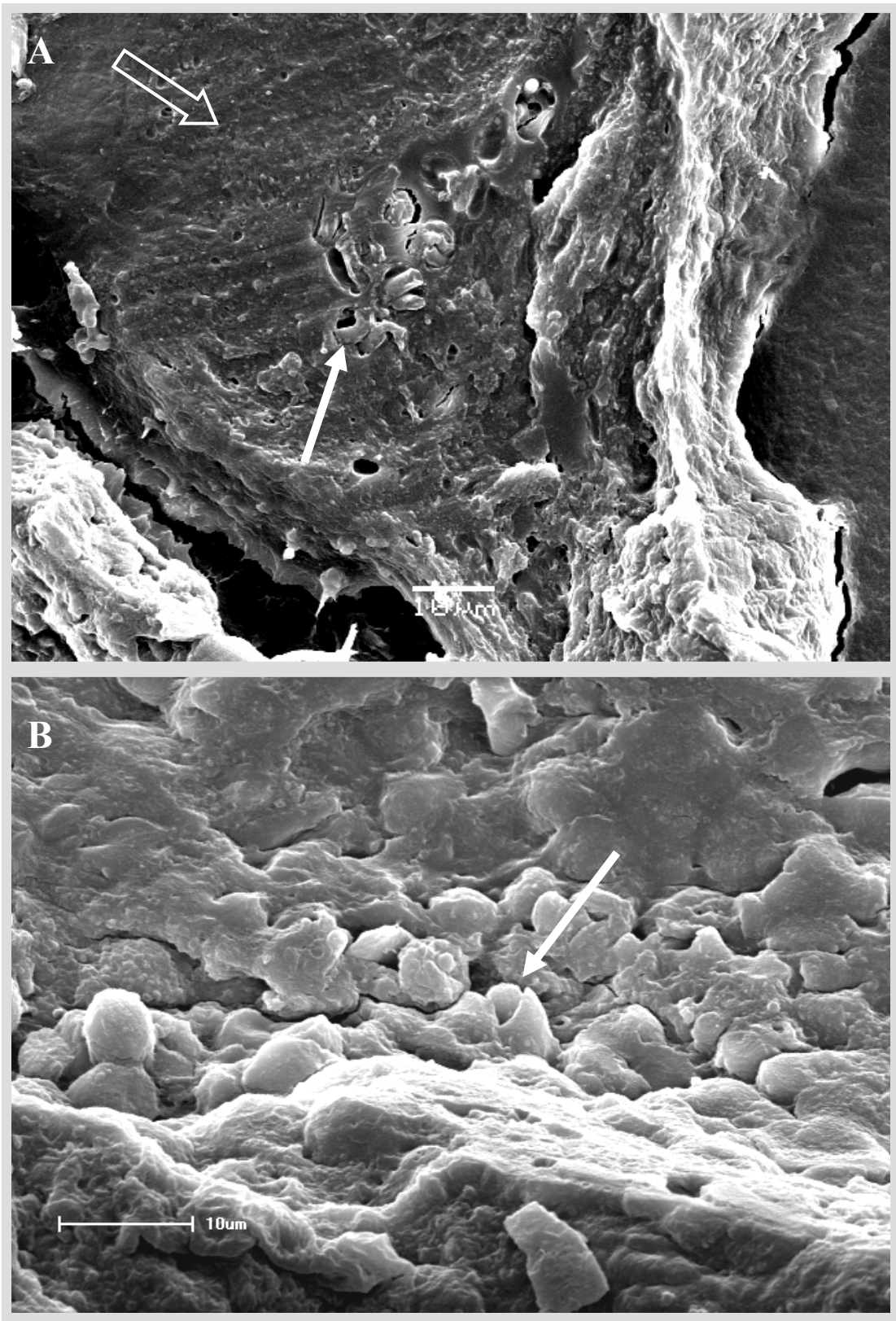




Tabela I

Etapas meios de inclusão (Protocolos)	Desidratação e/ou Diafanização	Pré-infiltração	Infiltração	Emblocação	Microtomia*	Remoção do meio de inclusão
Parafina	Desidratação em série alcoólica crescente, seguida de 3 banhos em xilol, por 5 minutos cada.	1:1 Xilol: Parafina, por 10 minutos, a 60°C.	Parafina: 3 banhos de 15 minutos, a 60°C.	Em meio específico, com solidificação à temperatura ambiente	Cortes de 20 µm obtidos em micrótomo e distendidos em lâminulas contendo 3 diferentes substâncias de aderência: albumina (5,5%) gelatina 0,1% e gelatina 1%.	2 Banhos em xilol, por 5 minutos, à temperatura ambiente, seguidos de 2 banhos em álcool 100%, por 10 minutos, e secagem à temperatura ambiente.
Paraplast	Desidratação em série alcoólica crescente, seguida de 3 banhos em xilol, por 5 minutos cada.	1:1 Xilol: Paraplast, por 10 minutos, a 58°C.	Paraplast: 3 banhos de 30 minutos, a 58°C.			
PEG (1)	Desidratação em álcool 70% por, no mínimo, 2 horas.	1:1 Álcool 70%; PEG por 2 h em frasco tampado, a 60°C e, posteriormente, 24 h em frasco destampado, a 60°C	PEG por 24 h, em frasco aberto, a 60°C.	Em meio específico, com solidificação a frio (freezer -20°C)		2 banhos em água, por 5 minutos, seguidos de secagem à temperatura ambiente.
PEG (2)	-----	3:1 Água: PEG por 2 h em frasco tampado a 60°C; 1:1 Água: PEG em frasco tampado por 2 h, a 60 °C e, posteriormente 12 h em frasco destampado, a 60°C.	PEG por 12 h, em frasco aberto, a 60°C.			

PEG: polietilenoglicol 1500 puro; MEV: microscopia eletrônica de varredura; *Cortes longitudinais visando porções entre o topo do testículo e a ampola.

----- : não foi necessária a realização dessa etapa.

Tabela II

Protocolo	Tempo de processamento	Fragilidade	Toxicidade*	Remoção do material de inclusão	Melhor substância de aderência	Preservação do material
Parafina	1h e 40 min	Extrema	Alta	Não avaliada	Não avaliada	Nenhuma
Paraplast	1h e 40 min	Alta	Alta	Parcialmente eficiente	Albumina 5,5%	Pouco preservado, sendo difícil a identificação das porções cortadas
PEG (Protocolo 1)	50h	Alta	Baixa	Eficiente	Gelatina 1%	Parcial
PEG (Protocolo 2)	28h	Nenhuma	Baixa	Eficiente	Gelatina 1%	Total

* Toxicidade em relação ao manipulador das substâncias utilizadas nos diferentes protocolos

Referências

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

5. Discussão Geral

Estudos a respeito do desenvolvimento do sistema reprodutor de aranhas, em nível morfológico, são bastante raros na literatura, notadamente, no que diz respeito ao desenvolvimento do sistema reprodutor masculino da aranha marrom *L. intermedia*, assunto do presente trabalho. Este estudo fornece importantes dados para estudos comparativos futuros em outras espécies de aranhas e nos permite melhor compreender a estratégia reprodutiva dessa espécie de interesse da saúde pública no Estado do Paraná, Brasil.

A sequência de desenvolvimento do sistema reprodutor masculino contempla estruturas mais internas em relação às mais externas, ocorrendo de maneira similar ao processo em fêmeas de *L. intermedia*. O desenvolvimento do sistema reprodutor feminino é estabelecido por uma sequência de eventos, priorizando o surgimento dos ovários, seguido pelo aparecimento dos ovócitos em vitelogênese e, posteriormente, observa-se a formação dos ductos dos ovidutos e *uterus internus* e, por último, das espermatecas (MARGRAF & COSTA-AYUB, 2006).

A maturação sexual em machos de *L. intermedia* parece ser precoce em relação a outras aranhas, uma vez que ela tem início em animais em fase juvenil (cinco ecdises) que precisam sofrer uma ou mais ecdises antes de atingir a fase adulta (FISCHER, 1996). Como o desenvolvimento pós-embrionário de *L. intermedia* é assincrônico, o tempo das ecdises que determinarão a transição da

fase juvenil para a adulta não pode ser previamente determinado. Em

Pholcus phalangioides, aranha haplógina da família Pholcidae, o desenvolvimento pós-embriônico é bastante sincrônico, podendo ser estabelecido o tempo (em semanas) das ecdises para que esse organismo atinja a fase adulta (MICHALIK & UHL, 2005).

No presente trabalho, demonstrou-se que a maturidade sexual em machos de *L. intermedia* já começa a ser estabelecido na quinta ecdise, quando várias etapas do processo de espermatogênese já são visualizadas no interior do testículo, ainda que a diferenciação do palpo em órgão copulatório ocorra somente a partir da sexta ecdise (FISCHER, 1996).

A espermatogênese em *L. intermedia* é também contínua no adulto, confirmada pela observação de células em processo de meiose e de espermiogênese no tecido testicular, o que está de acordo com o descrito na literatura para as espécies que apresentam um tempo longo de vida adulta e copula várias vezes, como é o caso da aranha marrom (MICHALIK & UHL, 2005).

A única descrição do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino em aranhas mostra que o processo de espermatogênese em *P. phalangioides* tem início apenas poucas semanas antes da ecdise que precede a formação do adulto, portanto, a sua maturidade sexual é mais tardia quando comparada à *L. intermedia*, que necessita de um tempo maior para completar seu desenvolvimento (MICHALIK & UHL, 2005).

As descrições da literatura, em geral para machos de aranhas adultas, apontam para a conexão dos testículos diretamente ao *vasa deferentia*, que é um par de túbulos alongados e contorcidos estendendo-se longitudinalmente na região posterior do corpo (SIMEÓ *et al.*, 2009). Em *L. intermedia*, os testículos se conectam ao *vasa deferentia* por meio de duas estruturas, um fino ducto e uma ampola volumosa, as quais são aqui descritas pela primeira vez para aranhas. Essa peculiaridade do sistema reprodutor de *L. intermedia* pode ter implicações filogenéticas e/ou taxonômicas e/ou evolutivas.

A diversidade morfológica dos espermatozóides em aranhas, fundamentada em estudos de ultraestrutura e de seus distintos modos de transferência para o corpo da fêmea, tem sido um carácter usado na definição de táxon desde o século XIX e, mais recentemente, no estabelecimento de relações filogenéticas desse grupo de organismo (MICHALIK *et al.*, 2004a e b; MICHALIK *et al.*, 2005a e b; MICHALIK *et al.*, 2006; MICHALIK & HUBER, 2006). Outros caracteres, como a morfologia externa e, mais recentemente, aspectos moleculares também têm sido utilizados no estabelecimento de relações filogenéticas em aranhas (MICHALIK *et al.*, 2006). Com relação à morfologia interna das aranhas, com foco nas peculiaridades de seu sistema reprodutor, são raros os relatos na literatura que a considera no estabelecimento de relações filogenéticas e/ou como tendo implicações taxonômicas e evolutivas.

Segundo Eberhard & Cordeiro (1995) não se pode deixar de considerar o papel da seleção sexual na origem de variações na morfologia genital de uma espécie. Evidências dessa afirmação podem ser vistas em Masta & Maddison

(2002) cujos estudos demonstraram que a diversificação da genitália de populações de *Habronattus pugillis*, da família Salticidae, é resultante do processo de seleção sexual.

Um mecanismo de seleção sexual pode ser estabelecido devido às secreções produzidas e liberadas por estruturas do sistema reprodutor masculino de aranhas que, ao constituir um bloqueio à entrada de outros espermatozóides, determina um processo de competição entre os machos (HUBER, 2005; BURGER *et al.*, 2006a). No receptáculo das fêmeas de *Silhouettella loricatula*, espécie de aranha haplógina da família Oonopidae, são encontrados espermatozóides de cada macho envoltos por uma capa de secreção, sendo o conjunto ejetado durante a cópula, demonstrando-se assim um outro processo de seleção sexual nessa espécie (BURGER *et al.*, 2006b).

Em *L. Intermedia*, a transferência dos espermatozóides para o corpo da fêmea no momento da cópula, ocorre na forma de *symspermy*, (uma grande quantidade de espermatozóides, envoltos por uma secreção glicoprotéica) (COSTA-AYUB & FARACO, 2006), o que indica que deve haver mecanismos de seleção sexual atuando nessa espécie. Para machos de *Indicoblemma lannaianum*, espécie de aranha haplógina pertencente a família Tetrablemmidae, somente uma pequena quantidade de espermatozóides é produzida e transferida no momento da cópula, o que indica a ocorrência de pouca ou nenhuma competição dentro da fêmea (BURGER, *et al* 2006a).

A presença de estruturas como o ducto e a ampola, como caracteres divergentes de *L. intermedia*, podem ainda estar relacionadas com um maior controle na seleção dos espermatozóides e com aspectos de sua funcionalidade como nutrição, proteção e ativação no corpo da fêmea, garantindo o sucesso na fertilização.

Em machos de *P. phalangioides* diferentes tipos de secreção são produzidas pelo *vas deferens* e testículos e também dentro do órgão copulatório, potencialmente, apresentando distintas funções (MICHALIK & UHL, 2005). Em *L. intermedia*, similarmente, diferentes tipos de secreções são produzidas pelos testículos, *vas deferens* e ampola, as quais, certamente, desempenham distintas funções no processo reprodutivo dessa espécie.

Morfologicamente, as secreções observadas nos testículos e *vas deferens* de *L. intermedia* são distintas das descritas para outras espécies (MICHALIK *et al.*, 2005; MICHALIK & UHL, 2005; MICHALIK & HUBER, 2006) e, conjuntamente com a secreção da ampola, caracterizam uma divergência na composição do fluido seminal, que pode também estar atuando em mecanismo de seleção sexual espécie-específico baseado no estabelecimento da prioridade de espermatozóides.

Durante as análises de morfologia do ducto e da ampola em MEV houve a necessidade de se estabelecer uma técnica mais específica devido ao pequeno tamanho e fragilidade dessas estruturas.

Em geral, as análises convencionais para MEV envolvem dissecação, fixação, desidratação e passagem por ponto crítico. Posteriormente, o material é colocado sobre lamínula contendo substância de aderência e orientado sobre suporte metálico. O conjunto é passado por processo de metalização previamente à observação em MEV.

Tentativas prévias, utilizando os protocolos usuais de MEV, mostraram-se inadequadas para uma descrição morfológica mais acurada de estruturas íntegras e/ou fraturadas do sistema reprodutor masculino da aranha marrom *L. intermedia*.

Assim, procurou-se avaliar diferentes protocolos para a obtenção de cortes de tecidos do sistema reprodutor masculino de *L. intermedia*, a fim de se obter uma técnica que aliasse a manutenção das características teciduais com a praticidade do procedimento a ser realizado com vistas a possibilitar uma análise rápida de estruturas biológicas pequenas e frágeis em MEV. Experimentos utilizando os meios de infiltração parafina, paraplast e PEG 1500 e distintas substâncias de aderência dos cortes à lamínula como albumina 5,5%, gelatina 0,1%, e gelatina 1%, foram realizados.

A passagem dos tecidos dos testículos, ductos e ampolas em xilol levou a uma visível retração dos mesmos e a um aumento da sua fragilidade. Posteriormente, ao proceder a inclusão em parafina, observou-se uma desidratação acentuada do tecido, resultando em um material bastante quebradiço e de difícil manuseio. A passagem pelo xilol parece comprometer a integridade dos tecidos e impedir a infiltração pela parafina, impossibilitando a continuidade do procedimento. Com o

uso do paraplast, os efeitos do xilol foram semelhantes e a infiltração parece ter sido parcial, mostrando também um resultado não satisfatório.

O PEG é um polímero que tem sido utilizado como um meio de infiltração de tecidos para análises em microscopia de luz há anos, apresentando uma boa preservação da estrutura tecidual.

A fácil remoção do polietilenoglicol dos tecidos com água torna esse polímero um meio prático para o uso em MEV. Houve uma maior facilidade em realizar os protocolos envolvendo esta substância, visto que poucos passos foram necessários para se concluir os procedimentos. Esse meio apresentou excelente infiltração e preservou melhor a estrutura geral dos tecidos e das membranas celulares, possibilitando análises morfológicas mais precisas em MEV. Com o uso desse material de inclusão, foi possível distinguir das células no interior do testículo, devido à ótima preservação dos contornos celulares, um *synspermium*.

6. Considerações Finais

O desenvolvimento do sistema reprodutor masculino prioriza a maturação dos testículos e posteriormente dá-se a diferenciação do ducto, da ampola e do *vas deferens* na sexta ecdise.

A maturidade sexual em machos *L. intermedia* acontece após a modificação dos pedipalpos em palpos contendo o bulbo copulatório, que ocorre a partir da sexta ecdise. Em nível morfológico, observou-se que os os caracteres

sexuais internos de macho desta espécie, já estão completamente desenvolvidos e aptos para cópula na quinta ecdise.

O ducto é composto por um epitélio não glândular, compacto e parece controlar a passagem do *synspermium*, podendo estar selecionando os mesmos.

A ampola produz uma secreção glicoprotéica que é depositada ao redor do *synspermium* e constitui o local de estocagem dos mesmos, podendo estar atuando em vários aspectos de sua funcionalidade, como nutrição, proteção e ativação no corpo da fêmea. Estas estruturas, provavelmente, tiveram um papel significativo na seleção sexual de *L. intermedia*, sendo de grande importância para o sucesso reprodutivo desta espécie.

A presença de estruturas peculiares no sistema reprodutor masculino de *L. intermedia* foi favorecida pela seleção e pode estar relacionada à ampliação das estratégias evolutivas de reprodução dessa espécie.

PEG 1500, aliado ao uso da gelatina 1% (como substância de adesão à lamínula), pode ser empregado como meio de infiltração na obtenção de cortes de estruturas do sistema reprodutor da aranha marrom *L. intermedia* e, provavelmente, para outros tecidos pequenos e frágeis dessa espécie e de outros invertebrados, com a finalidade de realizar análises morfológicas acuradas em MEV.

O presente trabalho contribui para o debate de questões ainda controversas relacionadas com as variações morfológicas encontradas no sistema reprodutor

masculino de *L. intermedia* e podem vir a esclarecer aspectos evolutivos e filogenéticos relacionados a esta espécie, por isso, maior detalhamento morfológico em nível de microscopia eletrônica de transmissão se fazem necessários. Tais análises envolvendo as interações celulares presentes entre as células da parede do ducto e o *synspermium* estão em andamento e serão anexadas aos resultados desta dissertação.

7. Referências Bibliográficas

01. ALBERTI, G. Comparative spermatology of Araneae. **Acta Zoológica Fenica** 190, 17-34, 1990.
02. 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**, v. 37, p.627-632, 1999.
03. APPEL, M. H.; BERTONI DA SILVEIRA, R; GREMSKI, W; VEIGA, S.S.; Insights into brown spider and loxoscelism. **ISJ** 2: 152-158, 2005.
04. Atkin JA, Wingo CW, Sodeman WA, Flynn JE. Necrotic arachnidism. **Am. J. Trop. Med.** V. 7,p. 165-184, 1958.
05. BURGER, M.; MICHALIK, P.; GRABER W.; JACOB, A.; NENTWIG, W., KROPF, C. Complex genital system of a haplogyne spider (Arachnida, Araneae, Tetrablemmidae) indicates internal fertilization and full female control over transferred sperm. **Journal of Morphology**, v. 267, p. 166-186, 2006 a.
06. BURGER, M.; GRABER W.; MICHALIK, P.; KROPF, C. *Silhouettella loricatula* (Arachnida, Araneae, Oonopidae):A Haplogyne Spider With Complex Female Genitalia. **Journal of Morphology**, v. 267, p.663–677, 2006 b.
07. CAETANO, F.H. O Estado da arte da morfologia interna de formigas: XVIII Simpósio de Mirmecologia. **Biológico**, São Paulo, v.69, suplemento 2, p.189-193, 2007.
08. CARDOSO JLC. FRANÇA FO, EICKSTEDT VD, BORGES I, NOGEUIRA MT. Loxoscelismo: estudo de 242 casos (1980-1984). **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**, v. 1, p. 58-60, 1988.
09. COSTA-AYUB, C. L. S; **Estudo da espermatogênese e da morfologia do espermatozóides da aranha marrom Loxosceles intermedia Mello-Leitão**

(1934) (Araneae: Sicariidae), antes e após a transferência para o corpo da fêmea. Curitiba, 2006. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

10. COSTA AYUB, C. L. S.; FARACO, C. D. Ultrastructural aspects of spermiogenesis and synspermia in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). **Arthropod Structure & development**, v. 36 (2007), p. 41-51. 2006.

11. COSTA-AYUB C. L. S., FARACO, C. D., FREIRE, C. A.; Evaluation of fixative solutions for ultrastructural analyses of brown spider (*Loxosceles intermedia*) (Araneae: Sicariidae) tissues. **Braz. J. Biol**, 66(4): 1117-1122, 2006.

12. COUTINHO, F.M.B.; MELLO, I.L.; MARIA, L.C. de S. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 13 (1): 1-13, 2003.

13. Eberhard WG. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. **Evolution**, v. 58, p.1947–1970.

14. Eberhard WG. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Monographs in behavior and ecology. Princeton, NJ: Princeton University Press.

15. Eberhard WG, Cordero C. 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products — a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. **Trends Ecol Evol**, v. 10, p.493–496.

16. Eberhard WG, Guzmán-Gómez S, Catley KM. 1993. Correlation between spermathecal morphology and mating systems in spiders. **Biol J Linn Soc**, v. 50, p.197–209.

17. EBERHARD, W. G.; CORDERO, C. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. **Tree**, v.. 10, no.12, 1995.

18. 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.
19. FISCHER, M. L., 1993. **Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* HEINECKEN & LOWE, 1.832 (Aracnida; Loxoscelidae) e sua relação com o loxoscelismo ocorrente no município de Curitiba, Paraná, Brasil**. Monografia de Bacharelado em Biologia, Curitiba: Biologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
20. FISCHER, M. L. Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, Publicação da Pontifícia Uversidade Católica do Paraná, v. 3, n. 38, p. 66-86, 1994.
21. 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.
22. FISCHER, M. L. **Utilização do Habitat por *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 e *L. laeta* (Nicolet, 1849), no município de Curitiba, Pr. Uma abordagem experimental sobre os aspectos ecológicos e comportamentais**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr, 2002.
23. FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Determination of the maximum and minimum lethal tempetatures (LT50) for *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 and *L. laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae). **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 563-567, 2003.
24. Futrell J. Loxocelism. Am. **J. Med. Sci.** v. 304,p. 261-267, 1992.

-
25. FUTUYMA, D. J.. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto-sp: Funoec, 2002. 631 p.
26. Galis F. 1996. The application of functional morphology to evolutionary studies. **Trends Ecol Evol**, v. 11, p.124–129.
27. GAO, K.; GODKIN, J.D. A New Method for transfer of polyethylene glycol embedded tissue sections to silanated slides for immunocytochemistry' **The Journal of Histochemisrny and Cytochemistry**, v. 39(4), p. 537-540, 1991.
28. GERSTSH WJ. The spider genus *Loxosceles* in South America. **Bulletin American Museum Natural History**, v. 136, p.121-182, 1967.
29. GERTSCH, W.J.; ENNIK, F. The spider genus L. in North America, central America and West Indies (Aranae, Loxoscelidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v.175, n.3, p.264-360, 1983.
30. GILBERT. S. F.. **Embriology. Constructing the organism**. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.
31. GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annu. Rev. Entomol**,v. 48, p. 163–84, 2003.
- 32 HAYAT, M.A. Principles and techniques of electron microscopy. **Biological Applications**. Cambridge University Press, 4ed, 2000. 543p.
33. Hellriegel B, Ward PI. 1998. Complex female reproductive tract morphology: Its possible use in postcopulatory female choice. **J Theor Biol**, v. 190, p.179–186.
34. HUBER, B.A. Sexual selection research on spiders: progress and biases. **Bio. Rev. Camb. Philos Soc**, v. 80, p. 363-385, 2005.

35. KLANN A. E.; PERETTI A. V.; ALBERTI G. Ultrastructure of male genital system and spermatozoa of Mexican camel-spider of the *Eremobates pallipes* group (Arachnida, Solifugae) **The Journal of Aracnology**, v. 33, p. 613-621. 2005.
36. KRAUS E.; M. ARDUIM. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. **EDUR**, Seropédica. São Paulo. 198 p.
37. LANGMAN, J. M. Xylene: its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, metabolism and clearance. **Pathology**, v.26, n. 3, p. 301-309, 1994.
38. MÁLAQUE, C. M. S.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C. & FAN, H. W., 2002. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p.139-143.
39. Macchiavello A. Cutaneous arachnidism or gangrenous spot of Chile. **Pub. Health Trop. Med.** V. 22, p. 425-466, 1947.
40. MARGRAF, A.; COSTA-AYUB, C. L. S. 2006. **Estudo morfoanatômico da espermateca da aranha marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae: Sicariidae), em fase juvenil**. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa.
41. MARQUES DA SILVA, E.; FISCHER, M. L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, 2005.
42. MARQUES DA SILVA, E.; FISCHER, M. L. Occurrence of species of the genus *Loxosceles* Heineken and Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) in the Paraná State. **Anais da Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**, São Paulo, Brasil, p.51, 2000.

43. MARQUES-DA-SILVA, E.; SANTOS, R. S.; FISCHER, M. L.; RÚBIO, G. 2006. *Loxosceles* spider bites in the state of Paraná, Brazil: 1993-2000. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 12, p. 110-123.

44. MARQUES DA SILVA E. **Loxoscellismo no Estado do Paraná: epidemiologia dos acidentes causados por aranhas *Loxosceles* no período de 1993 a 2000**. Dissertação de mestrado da Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2002.

45. MARTENS, J. [Inst. Zool., Univ., D-6500 Mainz a. Rh.]: Genital Morphology, System, and Phylogeny of Harvestmen (Arachnida: Opiliones). - Ent. Germ. 3 (r/z): 051-068; Stuttgart 1976.

46. MARTINS, R.; KNYSACK, I.; BERTANI, R. A new species of *Loxosceles* of the *laeta* group from Brazil (Araneae; Sicariidae). **Zootaxa** 94:1-6, 2002.

47. MASTA, S.E.; MADDISON, W. P. Sexual selections drivind diversification in jumooer spiders. **PNAS**, v.99. n. 07, p. 4442-4447, 2002

48. MELLO-LEITÃO. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles* lowe. **Ann. Acad. Bras. de Ciencias**, v. 6, n.2., jun, 1934.

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

50. MICHALIK, P.; DALLAI, R.; GIUSTI, F.; ALBERTI, G. The ultrastruture of the peculiar synspermia of the Dysderidae (Araneae, Aracnida) **Tissue and Cell**, v.36, p. 447-460, 2004a.

51. MICHALIK, P.; HAUPT, J.; ALBERTI, G. On the occurrence of coenospermia in mesothelid spider (Araneae: Heptathelide). **Arthropod Structure & Development** v.33, 137-181, 2004b.

52. MICHALIK, P.; UHL, G. The male genital system of the cellar spider *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae, Araneae): development of spermatozoa and seminal secretion. **Frontiers of Zoology**, v. 2, p. 1-12, 2005.
53. MICHALIK, P.; DALLAI, R.; GIUSTI, F.; MERCATI, D.; ALBERTI, G. Spermatozoa and spermiogenesis of *Holocnemus pluchei* (Scopoli, 1763) (Pholcidae, Araneae). **Tissue and Cell**, v. 37, p. 489-497, 2005a.
54. MICHALIK, P.; KNOFLACH, B.; THALER, K.; ALBERTI, G. The spermatozoa of the one-palped spider *Tidarren argo* (Araneae: Theridiidae). **The Journal of Arachnology**, v. 33, p.562-568, 2005b.
55. MICHALIK, P._HUBER, B.A. Spermiogenesis in *Psilochorus simoni* (Berland, 1911) (Pholcidae, Araneae): Evidence for considerable within-family variation in sperm structure and development. **Zoology**, v. 109, p. 14-25, 2006.
56. MICHALIK, P.; SACHER, P.; ALBERTI, G. Ultrastructural Observations of Spermatozoa of Several Tetragnathid Spiders With Phylogenetic Implications (Araneae, Tetragnathidae). **Journal of Morphology**, v. 267, p. 129-151, 2006.
57. Ministério da Saúde – FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos**. Brasília; 1998.
58. MORAES, C. S. Avaliação da atividade funcional dos fagócitos em indivíduos expostos ocupacionalmente ou não ao xilol. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 122-125. 2005. Suplemento.
59. MORISHITA, R. **Detecção da atividade da fosfatase alcalina no ovário de *Loxosceles intermedia***. Curitiba, 2000. 82p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

-
60. MORISHITA, R. FERREIRA, S. A., SANTIAGO FILHA, A., FARACO, C, D., 2003. Studies on Oogenesis and Oviposition in the Brown Spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Siviidae). **The Anatomical Record**, v.273a, nº1, p.575-582.
61. RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 225-254, 2002.
62. RIBEIRO, L.A.; EICKSDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ETRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *L.* no estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, p. 19- 26, 1993.
63. Sams HH, Dunnick CA, Smith ML, King LE. Necrotic arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol**, v. 44, p. 561-537, 2001.
64. 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.
65. SCHNEIDER RIBEIRO, R. O.; **Análise comparativa estrutural e das propriedades biológicas das toxinas dermonecroticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**. 2007. Dissertação de mestrado (Biologia Celular e Molecular), UFPR.
66. SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONÇALVES Jr.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C. & FAN, H. W., 1.998. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 546-548.

67. SIMEÓ, C.G.; RIBESB, E.; ROTLLANT, G. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). **Tissue and Cell**, (2009, in press).

68. SOFFIATTI, P.; ANGYALOSY, V. Anatomy of Brazilian Cereeae (subfamily Cactoideae, Cactaceae): *Arrojadoa* Britton e Rose, *Stephanocereus* A. Berger e *Brasilicereus* Beckeberg.. **Acta Bot. Bras.** vol.21 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2007.

69. TALARICO, G.; GARCÍA HERNÁNDEZ, L.F.; MICHALIK, P. The male genital system of the New World Ricinulei (Arachnida): ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis with special emphasis on its phylogenetic implications. **Arthropod. Struct. Dev.** 37(5): 396-409, 2008.

70. UHL, G. Genital morphology and sperm storage in *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholocidae; Araneae). **Acta Zoologica** (Stokholm), v. 75, p.1-12. 1994,a.

71. 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,b

71. UHL, G. Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae) **European Arachnology**, 145-156, 2000.

73. Uhl G. 2002. Female genital morphology and sperm priority patterns in spiders (Araneae). In: Toft S, Scharff N, editors. European arachnology 2000. Aarhus: Aarhus University Press. p 145–156.