

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Renata Rank de Miranda

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA ESPERMATECA DE FÊMEAS
ADULTAS DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* MELLO- LEITÃO (1934)
(ARANEAE: SICARIIDEA), APÓS 24 HORAS DA TRANSFERÊNCIA DE
ESPERMATOZÓIDES

Curitiba

2010

Renata Rank de Miranda

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA ESPERMATECA DE FÊMEAS
ADULTAS DE *LOXOSCELES INTERMEDIA* MELLO- LEITÃO (1934)
(ARANEAE: SICARIIDEA), APÓS 24 HORAS DA TRANSFERÊNCIA DE
ESPERMATOZÓIDES

Monografia apresentada à
Coordenação de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial
para obtenção do título em
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Doutora Claudia Feijó Ortolani-Machado

Curitiba

2010

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	i
RESUMO.....	ii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1. ASPECTOS GERAIS.....	2
3.2. <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	2
3.2.1. Distribuição.....	2
3.2.2. Características.....	3
3.2.3. Aparelho reprodutor.....	4
3.2.4. Espermateca e secreção espermatecal.....	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	6
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES COLETADOS.....	8
4.3. IDENTIFICAÇÃO DA FÊMEA E MACHO ADULTOS.....	8
4.4. CÓPULA.....	9
4.5 SACRIFÍCIO E DISSECÇÃO.....	10
4.6 MONTAGEM TOTAL.....	11
4.7. MICROSCOPIA DE LUZ.....	12
4.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1. MONTAGEM TOTAL.....	14
5.2. MICROSCOPIA DE LUZ.....	15
5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	16
6. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÃO.....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Alimentação e manutenção de <i>L. intermedia</i>	7
FIGURA 2. Manutenção de <i>Tenebrio molitor</i>	8
FIGURA 3. Dimorfismo sexual.....	9
FIGURA 4. Preparação para sacrifício.....	10
FIGURA 5. Vista ventral das espermatecas.....	11
FIGURA 6. Vista ventral das espermatecas – procedimento KOH.....	14
FIGURA 7. Análise das espermatecas – montagem total.....	17
FIGURA 8. Vista geral em corte longitudinal das espermatecas	18
FIGURA 9. Análise da parede das espermatecas e disposição dos espermatozóides em sua extensão.....	19
FIGURA 10. Disposição dos espermatozóides em sincício.....	20
FIGURA 11. Glandulas espermateciais e musculatura lisa.....	21
FIGURA 12. Análise das espermatecas em MEV.....	22

Resumo

A aranha marrom, *Loxosceles intermedia*, é uma espécie venenosa e cosmopolita, amplamente distribuída no município de Curitiba. Como esses animais colonizaram os ambientes antrópicos com sucesso, são considerados um problema de saúde pública na região. A grande distribuição dessas aranhas está relacionada com a sua resistência – podendo passar semanas sem alimento ou água - e a sua alta capacidade reprodutiva, uma vez que fêmea armazena os espermatozóides dos machos com os quais copulou em estruturas denominadas espermatecas. O objetivo deste trabalho foi descrever, anatômica e histologicamente, as espermatecas de *L. intermedia*, 24 horas após a cópula. Para tanto, foram realizados três métodos de análise: montagem total (MT), microscopia de luz (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Fêmeas adultas foram coletadas e 24 horas após a cópula, anestesiadas e sacrificadas. Em seguida, o abdome foi fixado através da injeção de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 na região posterior, durante 15 minutos. Após esse período, sob microscópio estereoscópico, foram retirados o hepatopâncreas e ovários para a observação das espermatecas, que foram fixadas por mais 2 horas. Através da montagem total é possível analisar anatomicamente as espermatecas. Observou-se que a fêmea contém 2 espermatecas que se inserem próximas à fenda genital. Cada uma é formada por um ducto alongado, sinuoso e quitinizado, sendo encontrados poros em toda sua extensão. Em seu término, há um bulbo, de pequena dimensão se comparado ao comprimento do ducto, nos bulbos não foi detectado a presença de poros. Através deste método foi possível perceber claramente que o bulbo não é quitinizado. Em microscopia de luz, a região das espermatecas foi submetida ao protocolo padrão para emblocagem em historesina. Cortes seriados de 5µm foram corados com HE, azul de toluidina e PAS, e analisados ao microscópio de luz. Os resultados obtidos mostraram que a espermateca é revestida por um tecido glandular com núcleos basais. Foi detectada a presença de secreção espermatecal, composta por glicoproteínas básicas, na qual estão imersos espermatozóides, organizados em sincício, por toda a extensão das espermatecas. A MEV permitiu a observação dos poros nos ductos. Uma vez que esse órgão é capaz de manter espermatozóides por longos períodos após a cópula, o seu estudo é fundamental para limitar a reprodução de *L. intermedia* e, conseqüentemente, a incidência de acidentes loxoscélicos.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Loxosceles* é atualmente representado por cerca de 100 espécies, classificado dentro da família *Sicariidae* e ordem *Araneae*. Esses animais apresentam distribuição cosmopolita, podendo ser encontrados tanto no ambiente peridomiciliar como no intra-domiciliar. No Brasil já foram observadas oito espécies de *Loxosceles*, sendo quatro encontradas no estado do Paraná: *L. intermedia*, Mello-Leitão 1934, *L. gaucho* Gertsch, 1967, *L. laeta* Nicolet, 1849, e *L. hirsuta* Mello-Leitão, 1931 (MARQUES DA SILVA & FISCHER, 2005).

A *Loxosceles intermedia*, popularmente conhecida como aranha marrom, apresenta grande incidência no município de Curitiba, sendo a espécie responsável pelos altos índices de loxoscelismo na região. Acredita-se que um dos principais motivos do crescente número de acidentes loxoscélicos de loxoscelismo em Curitiba se deva a mudança de habitat desses animais, do peri para o intra-domiciliar. O aumento do desmatamento e da construção civil resulta na destruição do ambiente natural das aranhas, mas em contrapartida, elas encontraram no novo habitat condições ainda melhores de sobrevivência e reprodução. No ambiente intra-domiciliar elas estão protegidas da predação e contras as mudanças ambientais. Alimentam-se de pequenos insetos como formigas, traças e cupins, além de poderem sobreviver longos períodos sem comida ou água (FUTRELL,1992), sendo esta uma característica do gênero *Loxosceles*.

Esta espécie apresenta hábito tipicamente sedentário e noturno. Durante o dia ficam escondidas, preferencialmente em locais escuros, secos e quentes, sendo este o ambiente preferido para se desenvolverem. Elas são reconhecidas principalmente por sua coloração marrom-avermelhada uniforme, apresentando pernas longas, pelos no corpo, seis ocelos noturnos homogêneos divididos em três díades e fenda genital simples, ou seja, abertura sem presença de placa esclerotizada sobre o orifício genital. Os machos geralmente têm o corpo menor e pernas mais longas do que as fêmeas. Reproduzem-se preferencialmente nos meses mais quentes do ano, período no qual se observa um maior número de casos de loxoscelismo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal ampliar os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva da aranha marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) e, como objetivo específico a caracterização anatômo-morfológica das espermatecas das fêmeas, 24 horas após a cópula, por meio de técnicas de montagem total, microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais

Atualmente existem 34.000 espécies de aranhas descritas e agrupadas em aproximadamente 100 famílias. A Ordem *Araneae* é usualmente dividida em três sub-ordens, *Mesothelae*, *Mygalomorphae* e *Araneomorphae*. Dentro da sub-ordem *Araneomorphae*, as chamadas aranhas verdadeiras, encontram-se 32.000 espécies em 2.700 gêneros, agrupados em 90 famílias, entre elas a família *Sicariidae*, à qual pertence o gênero *Loxosceles* (FOELIX, 1982; FISCHER, 2000)

3.2. *Loxosceles intermedia*

3.2.1 Distribuição

O desmatamento e o crescimento de áreas urbanas favoreceram a mudança da *L. intermedia* do ambiente peridomiciliar para o intra-domiciliar. Outros fatores que possivelmente contribuíram para tal mudança, como a redução de seus predadores naturais (lagartixa, galinha e sapo, por exemplo). Essas aranhas também apresentam um grande poder adaptativo, conseguindo se desenvolver em ambientes antrópicos (MANGILI, 2003).

Ocorrem em todo o estado do Paraná, principalmente no município e região metropolitana de Curitiba devido ao clima favorável, hábito da população, construções antrópicas, área verde circundante, presença de muitos substratos e desequilíbrio ecológico (FISCHER, 2000).

Segundo Fischer e Marques da Silva (2005), a *L. intermedia* encontra-se em construções urbanas, pois estas fornecem melhores condições de reprodução e desenvolvimento, uma vez que as aranhas ficam protegidas das amplas variações climáticas.

3.2.2 Características

Existem várias características que permitem a identificação da espécie *L. intermedia* como, por exemplo, sua coloração marrom-avermelhada, poucos pelos no corpo, pernas longas e finas, abdome com o formato arredondado, seis ocelos noturnos homogêneos, divididas em três díades e dispostos em linha recurva, fenda genital simples, disposição dos pelos na região cefálica, relação entre a distância dos olhos posteriores à borda lateral a linha mediana (MELLO-LEITÃO, 1934; FISCHER, 2000). Outra característica determinante da espécie é a segunda perna maior do que a quarta, possuindo fórmula 2341 (FISCHER, 2000). Esta fórmula corresponde às medidas das quatro pernas da aranha, sendo que todas apresentam tamanhos diferentes, sendo a medida de cada uma numeradas de 1 a 4. O número 1 corresponde à medida da menor perna e o número 4 a da maior perna.

Esses animais apresentam dimorfismo sexual, sendo que machos e fêmeas podem ser facilmente distinguidos pelas médias de tamanho de pernas, a partir do terceiro ínstar e, quando adultos, também pelos pedipalpos. O maior comprimento das pernas e pedipalpos dos machos em relação às fêmeas reflete sua atuação no comportamento sexual (FISCHER, 2000). Além destas características, pode-se observar que as fêmeas geralmente apresentam um abdome maior e mais arredondado do que os machos.

A teia de *L. intermedia* é composta de fios irregulares e pegajosos, assemelhando-se a algodão. Há uma área de maior concentração de fios, de onde irradiam os demais. A teia é construída por toda superfície onde vivem as aranhas, sendo utilizada principalmente para a manutenção de suas presas após a caça (FISCHER, 1993 e 1996; MARQUES DA SILVA, 2002).

A alimentação desses animais é muito variada. Podem se alimentar de insetos, formigas, besouros, outras famílias de aranhas, restos alimentares, entre outros (FISCHER, 1996).

3.2.3 Aparelho reprodutor

A maturidade é atingida em diferentes instares entre os indivíduos de *L. intermedia*. As fêmeas geralmente atingem a maturidade entre o quarto e o sétimo instar ninfal, enquanto os machos do quinto ao sétimo (FISCHER, 1996).

Os órgãos sexuais internos nas aranhas são pares para machos e fêmeas. Os machos apresentam dois testículos longos e enovelados – situados no interior do abdome – que convergem para um ducto comum, que se abre na fenda genital. Os espermatozoides possuem flagelo enrolado em torno da sua cabeça e recebem uma capa proteica ainda no lúmen testicular. Um padrão para as aranhas é a transferência do esperma para os pedipalpos modificados e no momento da cópula, sua deposição nas espermatecas no interior do sistema reprodutor da fêmea (FOELIX, 1982; GILBERT, 1997).

Em aranhas fêmeas o aparelho reprodutor é constituído por um par de ovários, um par de ovidutos, um útero ímpar, seguido pela vagina que termina na abertura genital. Nos ovários alongados os ovócitos são presos à parede por um conjunto de células do epitélio ovariano (pedúnculo) e ligados aos seus respectivos ovidutos, que correm paralelos em direção à parte anterior do abdome, onde se unem formando uma bolsa única denominada útero (MORISHITA, 2000). Da abertura genital partem dois ductos terminados em saco de fundo cego denominado de espermateca ou receptáculo seminal. Nessa estrutura os espermatozoides são armazenados durante um período prolongado de tempo, cabendo à fêmea a fertilização dos ovos no momento adequado (FISCHER, 2000). Semanas ou meses passam entre a inseminação e a fertilização dos ovos (GERTSCH, 1967; UHL 1994).

Loxosceles, dentro da classificação, é considerado como gênero de aranhas haplóginas, pois possuem um órgão genital feminino simples e sem ductos de fertilização, diferentemente de aranhas enteléginas, que possuem órgão genital feminino mais complexo com ductos de fertilização pareados e epígeno (FOELIX, 1982, FISCHER, 2000).

O sistema reprodutor de fêmeas haplóginas possui tipicamente uma cavidade genital ectodermal, a espermateca com cada ducto simples conectado ao lúmen espermatecal e a cavidade genital. Contrariamente a isso, aranhas enteléginas possuem espermateca consistindo de dois ductos separados: um para entrar o fluido seminal na placa esclerotizada, chamada de epígeno, e o outro ducto de fertilização

que leva para a cavidade genital da espermateca, lugar onde ocorre a fertilização (UHL, 2000).

Essa diferença entre aranhas haplóginas e enteléginas implica no armazenamento e na utilização do esperma. Na situação haplógina, o último esperma que entra, ou seja, o último macho que copula tem prioridade de esperma. Na situação entelégina, é o contrário, o primeiro macho tem a prioridade de esperma (AUSTAD, 1984).

3.2.4 Espermateca e Secreção espermatecal

As espermatecas se originam de invaginações do tegumento e morfologicamente são distinguidas em áreas que variam dependendo do gênero e espécie.

Aranhas do gênero *Grammostola* possuem pequenas variações específicas, com forma básica de pregas, mas todas tendo uma área distal em fundo de saco esferóide, um colo bem marcado e um ducto. Esse último se anexa à parede ventrolateral da vagina e desemboca na abertura epigástrica, oculta pela prega epigástrica (CARLO, 1973).

Em *Antrodiaetus*, os dois pares de espermatecas estão organizados em uma única linha transversal. Abrem-se em canais curtos por meio de uma parede cuticular fina para a parte anterior da bursa copulatória, a qual, por sua vez, tem uma saída comum com o útero e a abertura genital. Cada espermateca consiste de um terminal de bulbo com parede espessa e cutícula esclerotizada, também, como uma bolsa mediana e ducto proximal estreito, ambos fortemente esclerotizados com cutícula espessa. O lúmen da espermateca é grande nas regiões do bulbo e do divertículo posterior, mas muito estreita no ducto (COYLE, 1968, 1971).

As espermatecas de *L. intermedia* foram inicialmente estudadas por Costa-Ayub (2006), que demonstrou que são do tipo fundo de saco, com um ducto simples que leva e traz o sêmen, desembocando no teto do *uterus externus*. Seu epitélio é do tipo pseudoestratificado e secretório, constituídos por unidades glandulares compostas por mais de uma célula secretória.

A existência de células secretoras que integram a capa epitelial coloca em evidência a função glandular que cumpre a espermateca, compensando, desta maneira, a falta de glândulas acessórias espermatecais. As funções desta secreção

ainda são controversas. A secreção das células mencionadas e das reações características dos mucopolissacarídeos, possivelmente sirva para conservar o estado ativo dos espermatozóides acumulados na espermateca durante o tempo entre a cópula e a fecundação, que pode demorar vários meses (CARLO, 1973). No entanto, segundo Uhl (1994), a secreção espermatecal serve apenas para a manutenção da matriz para mantê-los na posição específica dentro do trato genital. Os espermatozóides são armazenados no estado inativo, sendo assim, acredita-se que não sofram gasto energético.

Em *Antrodiaetus*, cada espermateca é circundada por uma glândula espermatecal, que libera secreções, presumivelmente liberada no lúmen da espermateca através de canais que penetram no ducto e na bolsa cuticular, mas parecem ser raros ou inexistentes no bulbo esclerotizado cuticular (COYLE, 1968, 1971).

As glândulas epidermais (incluindo as glândulas espermatecais) associadas com as genitálias de aranhas fêmeas produzem lubrificação, facilitando a inserção do palpo masculino e ferormônios sexuais, além de proporcionar um ambiente mais controlado e protegido à longo prazo para o armazenamento do esperma e talvez uma mistura mais eficiente de esperma com ovos durante a ovoposição (KOOVOOR, 1982).

As unidades glandulares liberam suas secreções para o lúmen das espermatecas através de poros. Esses poros só foram observados por Michalik e colaboradores (2005), em *Antrodiaetus unicolor*, na região do ducto, mais esclerotizado, estando ausentes no bulbo (pouco esclerotizado).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e manutenção de *Loxosceles intermedia*

A grande maioria das fêmeas e machos adultos utilizados foram obtidos na região metropolitana de Curitiba e de Ponta Grossa, tanto no ambiente intradomiciliar quanto no peridomiciliar. Foram analisadas também aranhas que nasceram no laboratório.

Todos os animais foram individualizados em recipientes plásticos, com tampas contendo pequenos furos para passagem de ar, apresentando um volume

aproximado de 140 ml e, por fim, enumerados de acordo com a ordem de chegada. Todas as aranhas foram catalogadas, constando no registro de cada uma o local e data de coleta (ou data de nascimento para as que nasceram no laboratório), sexo, porte do animal, mudas observadas (fase do desenvolvimento), além de observações extras, como por exemplo, a integridade física do animal ou se ela foi e quando copulada no laboratório. Estas informações são necessárias e importantes para uma padronização experimental.

As aranhas foram colocadas em estufa, com temperatura constante, em torno de 27° C. O ambiente escuro e relativamente quente, similar ao que esses animais procurariam na natureza, proporcionou um ambiente favorável ao seu desenvolvimento e reprodução.

A alimentação foi feita com larvas do besouro *Tenebrio molitor*. A cada duas semanas foi oferecida uma larva por aranha e colocada uma pequena porção de algodão embebido com água (FIGURA 1). A razão para a escolha de larvas dos besouros de *Tenebrio molitor* para a alimentação das aranhas é que esse animal é relativamente fácil de obter e de se manter em laboratório. Eles foram mantidos no laboratório em uma caixa de plástico de 3 litros, ventilados e abrigados da luz direta (FIGURA 2). Foi oferecido pão para sua alimentação, mas pode-se dar, também, farelo de trigo ou aveia. Para a alimentação das aranhas bem pequenas foi dada larva de *Drosophila*, pois as de *Tenebrio* muitas vezes comiam as aranhas pequenas.



FIGURA 1 – Alimentação das aranhas



FIGURA 2 – Caixa de manutenção dos *Tenebrio molitor*.

4.2. Identificação dos espécimes coletados:

Para confirmação da espécie, no laboratório, os animais coletados foram identificados com base nas seguintes características descritas por MELLO-LEITÃO (1934):

- coloração marrom-avermelhada, tamanho médio de 4 cm, poucos pêlos no corpo e de disposição característica na região cefálica;
- a forma e sulcos limitantes laterais menos curvos da região cefálica;
- a relação entre a distância dos olhos posteriores à borda lateral e à linha mediana;
- pernas longas e finas;
- presença de seis ocelos noturnos homogêneos em três díades em linha recurva na região anterior do cefalotórax;
- presença de fenda genital simples – sem presença de placa esclerotizada sobre os orifícios genitais.

4.3. Identificação da fêmea e macho adultos

Para que sejam formados casais para a realização da cópula, é necessária a identificação do macho e da fêmea. Como apresentam dimorfismo sexual, é possível visualizar a diferença externamente. Assim, foram observados os seguintes itens:

- Fêmeas (FIGURA 3A): Abdome geralmente mais arredondado do que o dos machos. Ausência de órgão genital externo. Os pedipalpos são menores e sem a presença do bulbo copulatório. Presença de abertura genital simples.
- Machos (FIGURA 3B): apresentam um abdome mais alongado. Possuem as pernas relativamente mais longas do que as fêmeas. O par de pedipalpos é maior e apresenta um bulbo copulatório na extremidade, dentro dos quais são estocados os espermatozóides.

Os animais só realizarão a cópula quando tiverem atingido sua maturidade sexual.

Após efetuada a sexagem, os indivíduos machos e fêmeas foram acondicionados separadamente em recipientes plásticos sendo submetidos ao tratamento de rotina descrito anteriormente.

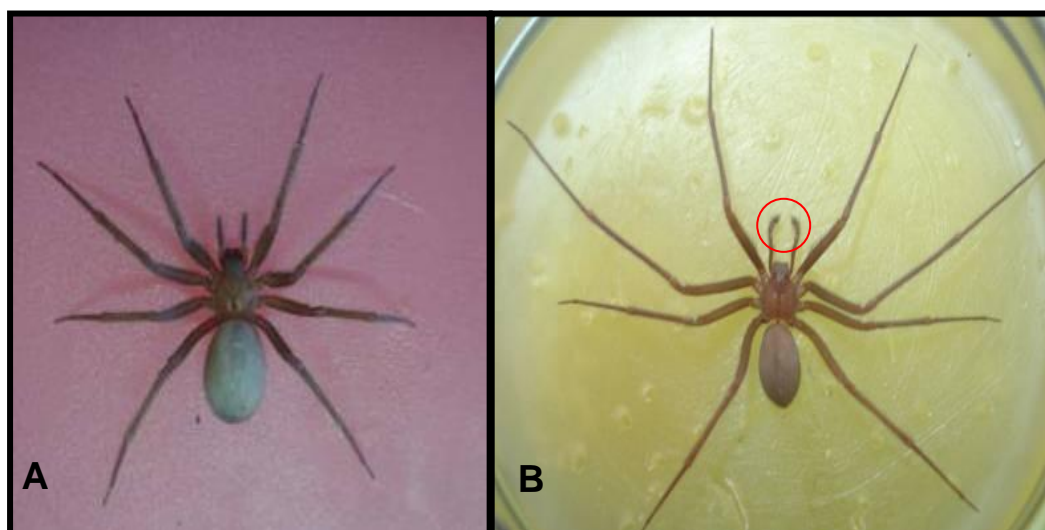


FIGURA 3 - *Loxosceles intermedia*. (A) Fêmea; (B) macho.

4.4. Cópula

Os animais adultos foram colocados em recipiente plástico transparente na proporção de um macho para uma fêmea, mantidos em local escuro e silencioso e monitorados constantemente até o momento da cópula. Após, os animais foram separados, pois se tornam agressivos. As fêmeas, 24 horas após a cópula, foram selecionadas para os estudos de análise morfológica das espermatecas.

4.5 Sacrifício e dissecação

Fêmeas adultas, totalizando um número de 10 para a análise em montagem total, 12 para MO e 6 para microscopia eletrônica de varredura, foram sacrificadas 24 horas após a cópula.

Para anestesia, as aranhas foram colocadas em recipiente contendo uma porção de algodão embebido em éter etílico (FIGURA 4A). O tempo para que a aranha fique completamente anestesiada varia muito de indivíduo para indivíduo, podendo levar de dez a trinta minutos. Posteriormente, foram fixadas pelo dorso do cefalotórax – com o auxílio de um alfinete entomológico, em placa de Petri preenchida com cera (FIGURA 4B), e tomadas as medidas do corpo e das pernas. A medição do segundo e quarto par de pernas nos permite identificar a espécie. Em *Loxosceles intermedia* o segundo par de pernas deve ser maior do que o quarto.

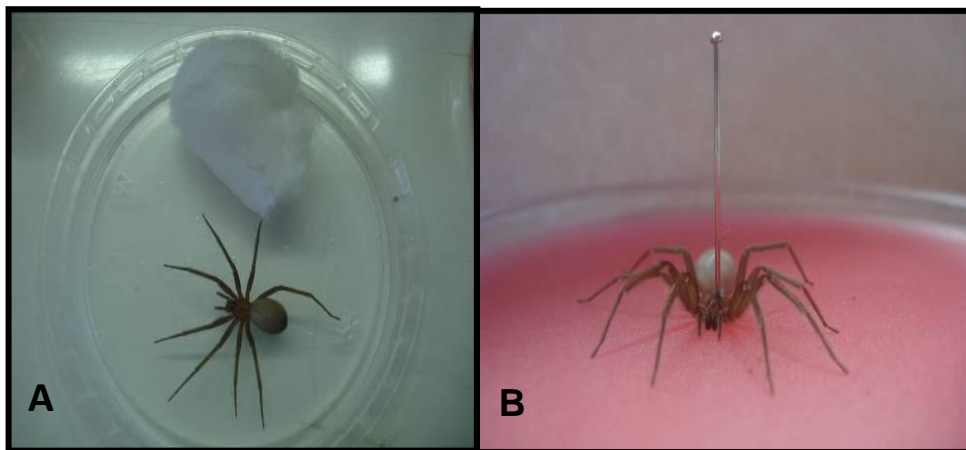


FIGURA 4 A - Aranha sendo anestesiada; B - Aranha presa pelo cefalotórax.

A próxima etapa consistiu em fixar o abdome do animal. Para isso foi utilizado o fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Com o auxílio de uma seringa, o fixador foi injetado no abdome da fêmea, através da fiandeira (localizada na extremidade posterior do abdome). Cerca de 15 minutos após a injeção do fixador, sob microscópio estereoscópio e com o auxílio de pinças finas, alfinetes entomológicos e tesoura oftalmológica, foi realizada a dissecação, que consistiu em uma incisão na região dorsal do abdome, iniciando próximo às fiandeiras e se estendendo até perto do cefalotórax. Em seguida, retirou-se o hepatopâncreas e ovários, para a observação da fenda genital e das espermatecas

(FIGURA 5). Uma vez localizada as espermatecas, iniciou-se o processo de limpeza, com a retirada dos músculos da região genital e externamente dos pelos da região ventral do abdome. Ambos os procedimentos foram realizados com o auxílio de microagulha.

Após a dissecação, o material permaneceu em solução fixadora até completar duas horas.

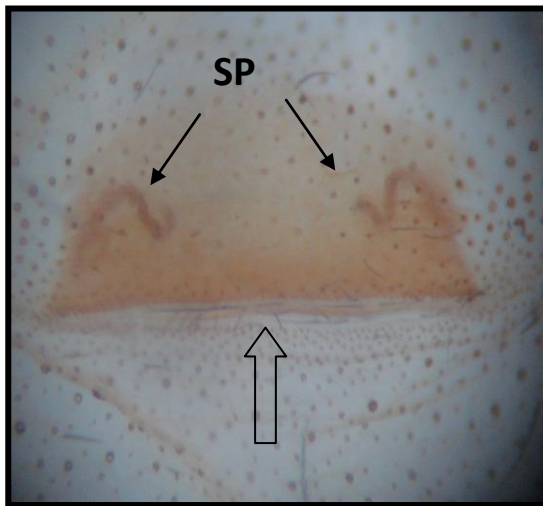



FIGURA 5 - Espermateca (SP) e abertura genital () em vista ventral.

4.6 Montagem Total

Para esta técnica, as espermatecas foram obtidas como descritas anteriormente, fixadas por 2 horas e, em seguida, lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e em água destilada.

O material, então, foi desidratado em série crescente de álcool etílico (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e, por fim, 100% por duas vezes), permanecendo durante dez minutos em cada um dos banhos. Em seguida, o material foi colocado em xilol I e em xilol II, permanecendo 3 minutos em cada, para que as espermatecas fossem diafanizadas, permitindo melhor observação das mesmas.

Por fim, o material foi colocado sobre uma gota de resina Permunt (Sigma) e voltadas para cima em lâmina histológica, de modo que as espermatecas ficaram imersas na resina. Finalizando o procedimento, foi colocada uma lamínula sobre o material imerso na resina, caracterizando uma montagem total.

As espermatecas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Axiophot – Zeiss.

4.7. Microscopia de luz

Após a obtenção do material (abertura genital + espermateca) e fixação, o material foi lavado duas vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e, em seguida, três vezes em água destilada.

Para preparar o material para a microscopia de luz, seguiu-se o protocolo para historesina. Trabalhos anteriores no laboratório mostraram que esta resina apresenta melhores resultados para estruturas pequenas quando comparados com outras resinas de emblocagem. Neste caso, o material passou por uma série crescente de álcool (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e dois banhos de álcool 100%), 10 minutos em cada álcool.

Em seguida, foi colocado em solução de historesina pura e álcool 100% (1:1), por duas horas, na geladeira. Após este período, passou para historesina pura, por uma semana, também na geladeira. Após muitas tentativas, constatou-se que este é o tempo necessário para que a resina infiltre bem em todo o material.

Completada uma semana de infiltração, iniciou-se o processo de emblocagem. Para tal, foi preparada uma nova solução. Esta consistiu em 400 µl de solução A (historesina) e 17 µl de solução B (pó ativador), para um recipiente de emblocagem de 417 µl. O material foi, então, colocado no recipiente de emblocagem com a nova solução preparada, e deixado no vácuo até a solução endurecer totalmente. O tempo de endurecimento variou. Completada essa etapa, o material, agora emblocado, estava pronto para ser cortado.

Foram realizados cortes seriados transversais do material, cada um com 5 µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas histológicas, cada uma com oito cortes. Estes foram colocados sempre em uma mesma ordem, para se saber qual foi o primeiro e o último corte e as lâminas numeradas, de modo a permitir a observação seriada da espermateca ao microscópio de luz. Para a distensão dos cortes, foi colocada uma gota de água destilada sobre lâmina e os cortes distendidos com a ajuda de um pincel. Quando todos os cortes estavam sobre a lâmina, a mesma foi colocada para secar em placa aquecida.

Para a observação e análise das espermatecas de *L. intermedia* ao microscópio de luz foram utilizados os corantes: Azul de Toluidina (AT), Hematoxilina – Eosina (HE) e por fim Ácido Periódico de Shiff (PAS).

Para a coloração com HE, devido a utilização da historesina, foi necessário fazer uma pequena variação na técnica básica para coloração com este corante, pois não há necessidade de passar pelos banhos de álcool e xilol. Assim, colocou-se as lâminas em uma cuba para a coloração contendo água destilada de forma a cobrir todos os cortes, por 5 minutos para hidratar o material. Em seguida, corou-se com hematoxilina, por 1 minuto e 20 segundos. Transcorrido esse tempo, as lâminas permaneceram em água corrente por dez minutos, para viragem da coloração. Em seguida, ficou na eosina por 20 segundos. Por fim, o material foi lavado três vezes em água destilada e colocado para secar em uma placa aquecedora. Finalmente, as lâminas foram montadas em resina Permount e observadas e fotografadas em microscópio fotomicroscópio Axiophot – Zeiss..

A coloração com Azul de Toluidina foi realizada para corar possíveis glicosaminoglicanas sulfatados na secreção espermatecal. Para esta técnica, as lâminas foram colocadas em uma cuba com água destilada, onde permaneceram por cinco minutos. Em seguida, foram então colocadas no AT foi de vinte minutos, lavadas em água destilada e colocadas para secar em placa aquecedora.

A reação histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi feita com a finalidade de verificar se a composição da secreção espermatecal de *L. intermedia* apresenta carboidratos básicos. Primeiramente as lâminas permaneceram durante 5 minutos em uma cuba de coloração com água destilada. Em seguida, a água foi descartada, e adicionado ácido periódico 0,5%, a 60°C durante 60 minutos. Transcorrido este período, as lâminas foram lavadas com água destilada para então adicionar o Reativo de Schiff, que reagiu durante 60 minutos, em local escuro a temperatura ambiente. Após esta etapa, as lâminas passaram por três banhos de água sulfurosa, 5 minutos cada. Feito isso, as lâminas permaneceram em água corrente por 10 minutos para posterior adição de hematoxilina, por 20 segundos. Por fim foi feito o ponto de viragem da coloração, deixando as laminaas em água corrente por 10 minutos, e então as laminaas foram secas em uma placa aquecida e montadas da mesma forma como descrito anteriormente.

4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para este tipo de análise, o procedimento para a obtenção e fixação das espermatecas de *L. intermedia* foi o mesmo descrito anteriormente no presente

trabalho. Depois de completadas as 2 horas de fixação do material, foi realizada uma limpeza extra com KOH 5%. Esse procedimento teve a finalidade de dissolver a maior quantidade possível de tecido que envolve a espermateca, a fim de obter apenas sua estrutura (FIGURA 6), para melhor análise ao microscópio eletrônico de varredura.



FIGURA 6. – Visão geral da região das espermatecas após limpeza com KOH. Lupa, aumento 40X.

Depois da limpeza com KOH 5%, o material foi desidratado em série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95%, 100% I e 100% II, sendo que cada banho foi de 10 minutos) montado em suporte e submetido ao ponto crítico. Após, foram colocadas em suporte e metalizadas, para a observação e registro fotográfico.

5. RESULTADOS

5.1. Montagem Total

Para a análise anatômica das espermatecas de *L. intermedia* foram utilizadas 10 fêmeas adultas, 24 horas após a cópula.

L. intermedia apresenta um par de espermatecas, separadas espacialmente, localizadas na região ventral do animal (FIGURA 7A). Cada uma é composta de um

ducto quitinizado, que parte de uma região, também quitinizada, próxima à fenda genital. Em geral, os ductos apresentam-se mais grossos na base, tornando-se afilados e sinuosos em seu comprimento (FIGURA 7B e 7C). A composição quitinosa da parede dos ductos impede a visualização do seu conteúdo interno.

No ápice de cada ducto encontra-se um bulbo (FIGURA 7D). Esta estrutura é notavelmente distinta do ducto por ser arredondada, com menor dimensão e não quitinizada. Sendo assim, a relativa transparência da parede do bulbo, possibilitou a observação de seu conteúdo interno (espermatozóides e secreção – confirmados pela MO). É possível observar que a massa de espermatozóides no interior do bulbo é circundada por uma região mais clara (FIGURA 7D).

Além disso, a técnica de montagem total permitiu a observação da presença de poros em toda a extensão dos ductos (FIGURA 7E). Esses poros, no entanto, não foram observados no bulbo, somente na região dos ductos.

5.2. Microscopia de Luz

Para a análise histológica das espermatecas de *L. intermedia* foram utilizadas 12 fêmeas adultas 24 horas após a cópula.

Foram analisados ao microscópio de luz cortes longitudinais de 5 μ m das espermatecas, corados com hematoxilina - eosina, azul de toluidina e ácido periódico de shiff. Essas colorações possibilitaram a visualização da disposição das espermatecas, a análise do conteúdo interno e os tipos de tecidos que compõe as espermatecas além da localização e dos espermatozóides no seu interior. (FIGURA 8A e 8B)

Com relação à parede das espermatecas, na microscopia de luz também é possível distinguir o bulbo do ducto, uma vez que o bulbo não apresenta quitina, portanto, não é possível visualizar a parede desta região (FIGURA 9).

Nos exemplares analisado, foram encontrados espermatozóides por toda a extensão da espermateca. No entanto, não houve registro de espermatozóides fora das espermatecas, como na abertura genital e útero. Lá, eles permanecem organizados em sincícios (FIGURA 10). Em alguns cortes, não foram encontrados espermatozóides em uma das estruturas (bulbo ou ducto), no entanto, não foi encontrada relação entre esta disposição dos espermatozóides com a morfologia

das espermatecas. Acredita-se que, devido ao processamento do material a massa de espermatozoides possa ter sido perdida em alguns cortes.

Cada espermateca é envolvida por glândulas espermatecais, com núcleos basais. Nos materiais corados com H.E, as células glandulares aparecem com o núcleo basal evidente (corado pela hematoxilina) e o citoplasma pouco evidente (FIGURA 11). Ao redor da região glandular, há tecido muscular liso esquelético (FIGURA 11).

Para a análise da secreção espermatecal, foi feita a reação histoquímica com PAS. A reação foi positiva, indicando a presença de glicoproteínas básicas no lúmen das espermatecas de *L. intermedia* (FIGURA 9B, 10A), sendo encontradas tanto no ducto como no bulbo.

Nos materiais corados com o A.T, não foi observada metacromasia, indicando, portanto, que não há glicosaminoglicanos sulfatados na secreção espermatecal (FIGURA 9)

5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das espermatecas de *L. intermedia* pela microscopia eletrônica de varredura possibilitou a confirmação de um resultado também fornecido pela montagem total, a observados em toda a extensão do ducto a presença de poros (FIGURA 12).

Os poros foram observados em toda a extensão dos ductos, no entanto, não foram encontrados na região do bulbo.

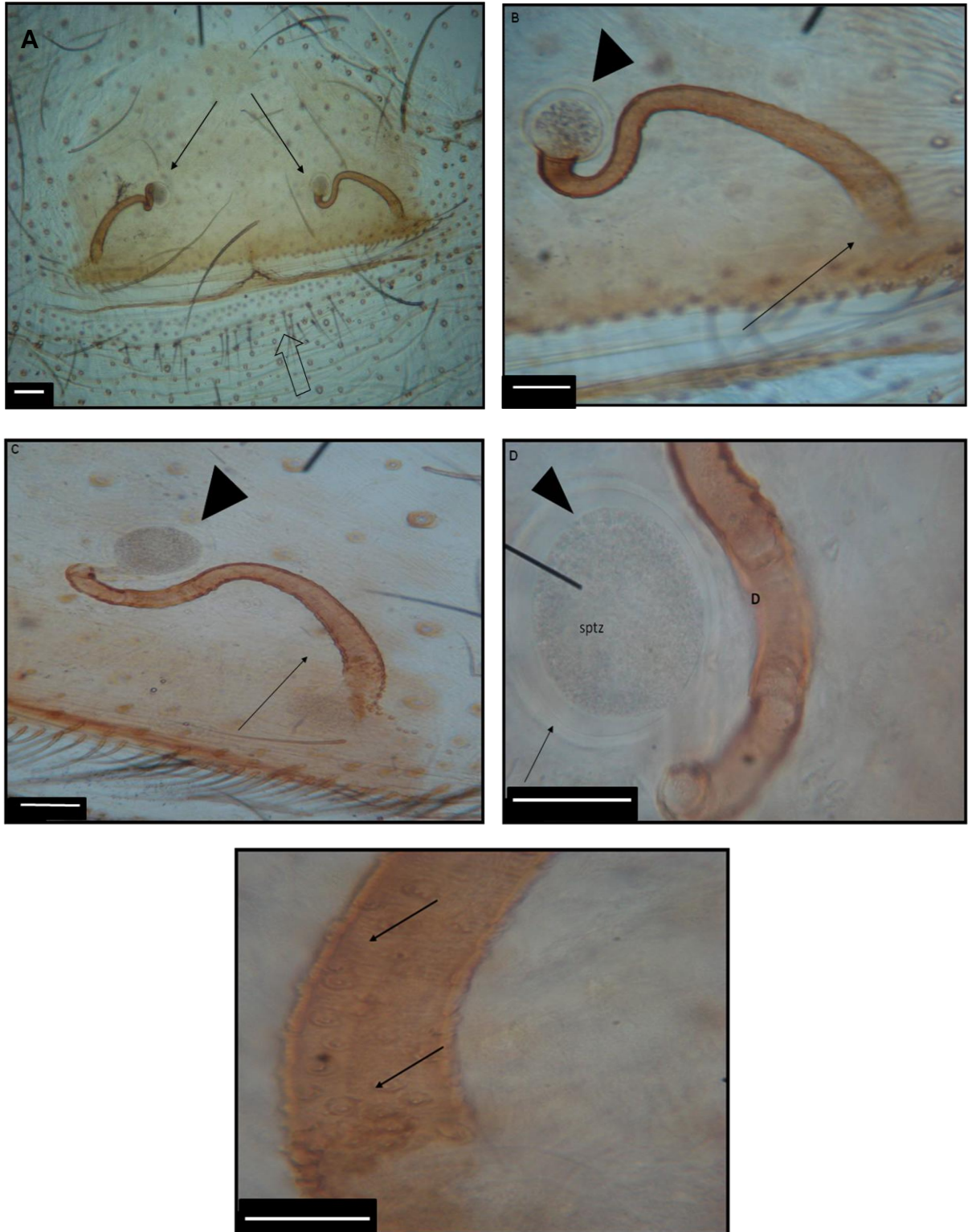


FIGURA 7. – Análise das espermatecas em Montagem Total. A – Vista ventral , presença de duas espermatecas separadas espacialmente (setas), partindo de uma região próxima á fenda genital (seta maior). Barra= 100 μ m. B, C – espermatecas compostas por duas regiões distintas: bulbo(cabeça de seta) e ducto (seta). Barra= 100 μ m. D – Bulbo com conteúdo interno visível (cabeça de seta) e parede relativamente transparente. Barra= 50 μ m. E – Preença de poros no ducto. Barra= 50 μ m.

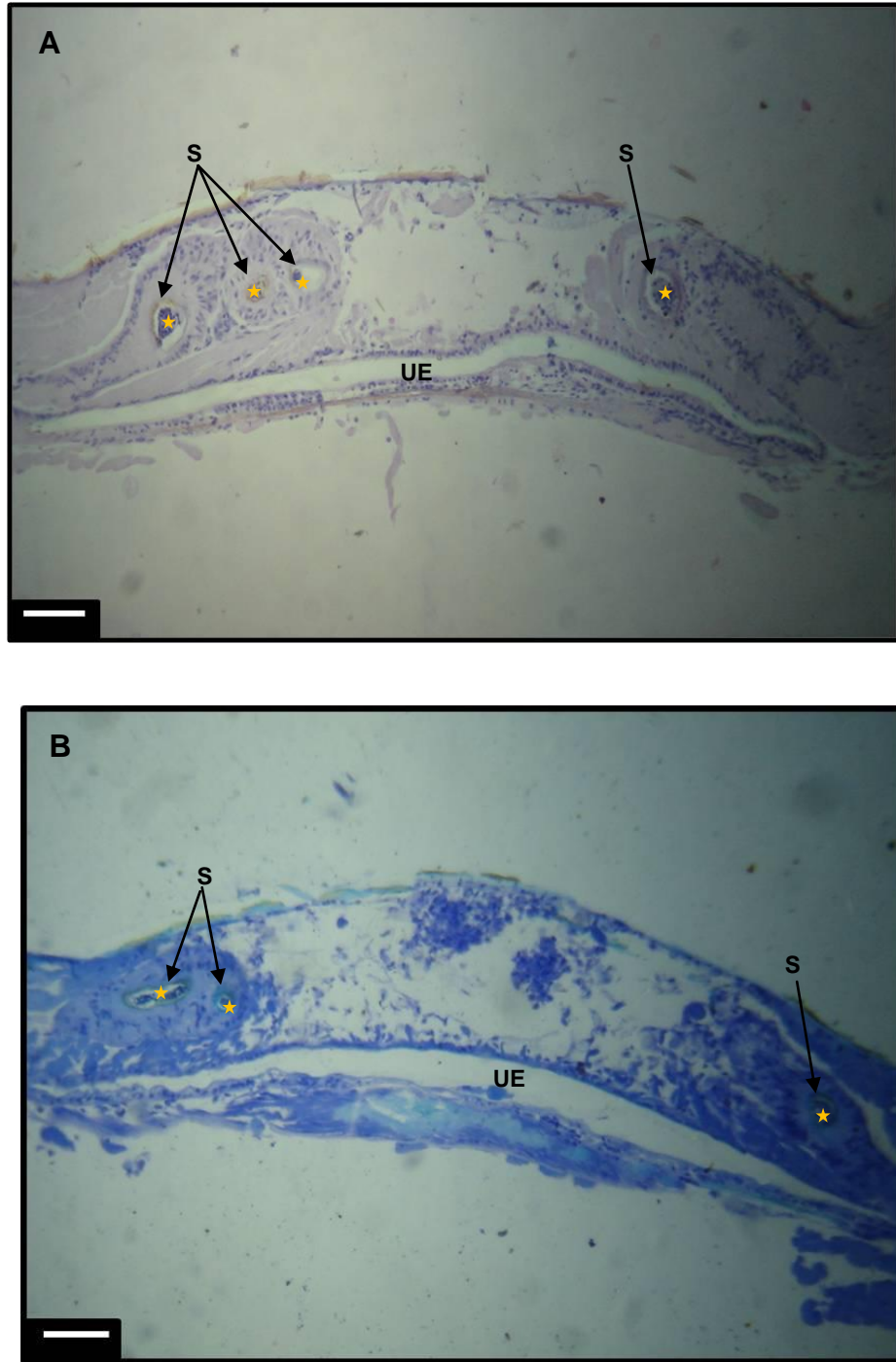


FIGURA 8. – Vista geral em corte longitudinal das espermatecas (S) de *L. intermedia*, mostrando a sinuosidade dos ductos quitinizados e o bulbo não quitinizado, ambas as estruturas com espermatozoides em seu interior (★), em duas colorações: HE (A) e AT (B). Barra = 100µm.

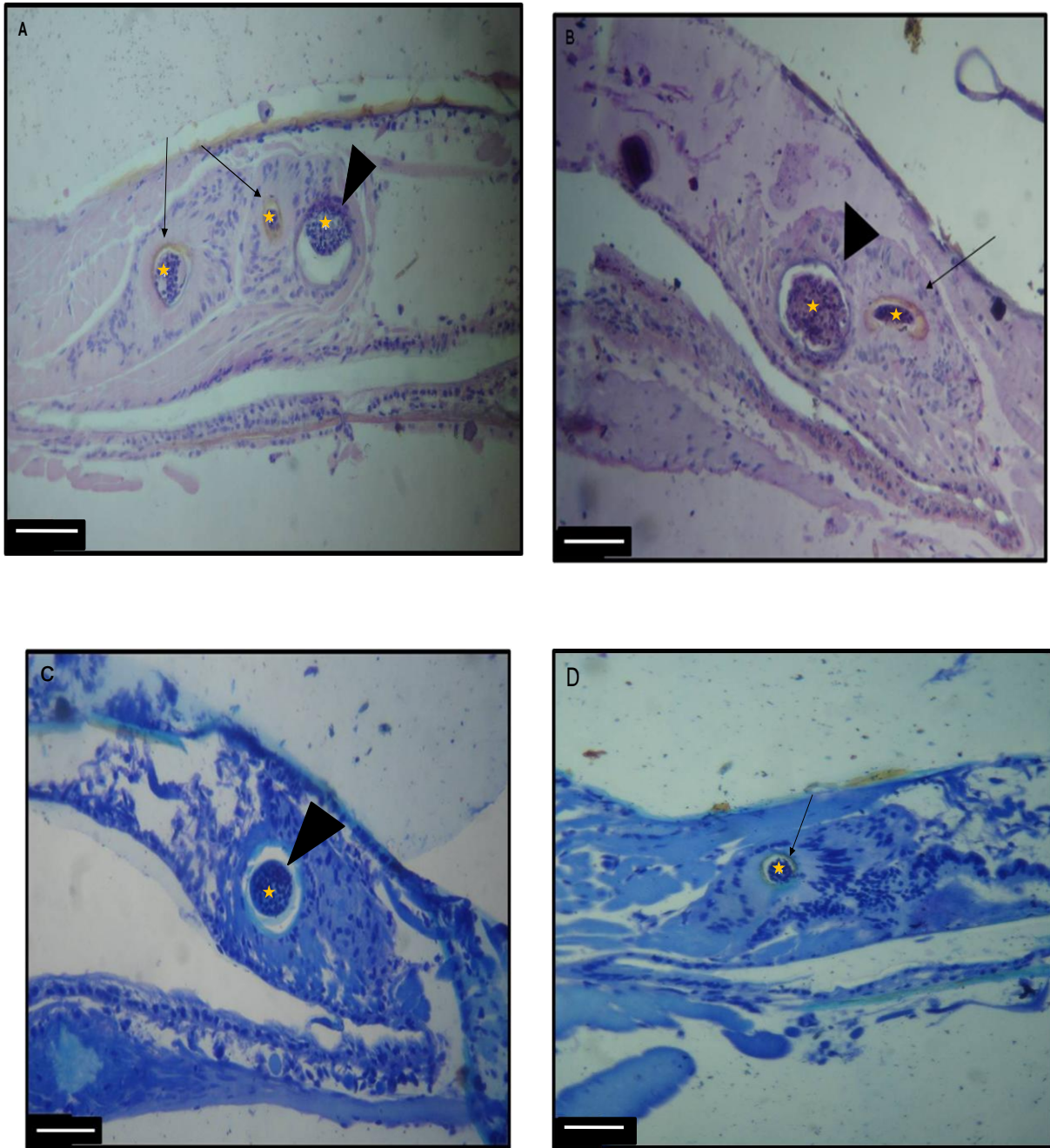


FIGURA 9. – Diferença entre a parede da do ducto (seta) e bulbo (cabeça de seta). Ducto apresenta-se quitinizado, sinuoso e de menor diâmetro do que o bulbo, o qual possui parede transparente. Em ambas as estruturas observa-se espermatozoides (★). A- HE. Barra = 100µm. B – reação positiva com PAS, indicando a presença de glicoproteínas básicas. Barra = 100µm. C, D – AT. Barra = 100µm.

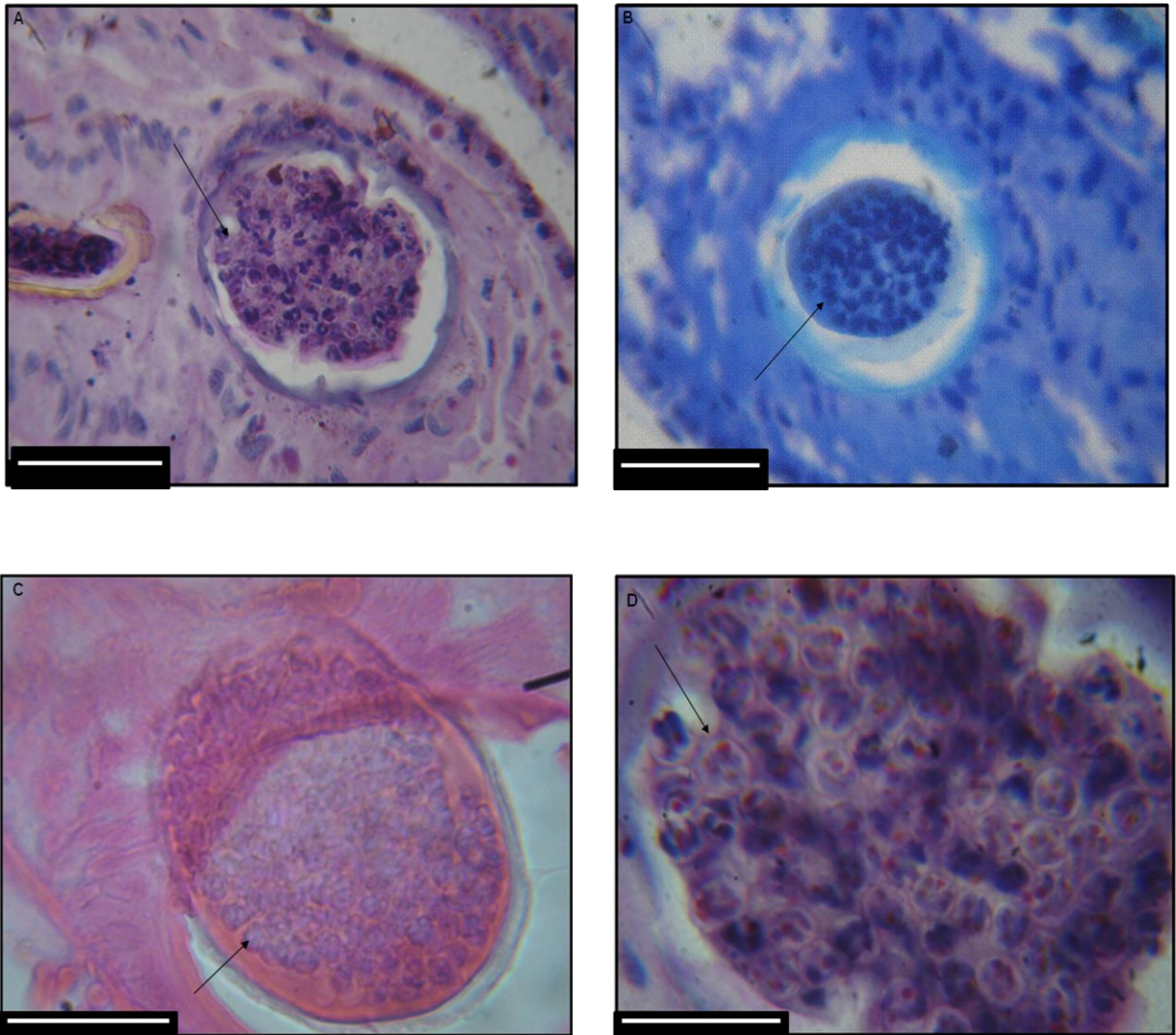


FIGURA 10. – Disposição em sincício dos espermatozóides (seta) no interior das espermatecas. A – PAS, reação positiva. B- AT. C – HE (imersão). D – PAS, reação positiva (imersão) Barra = 100 μ m.

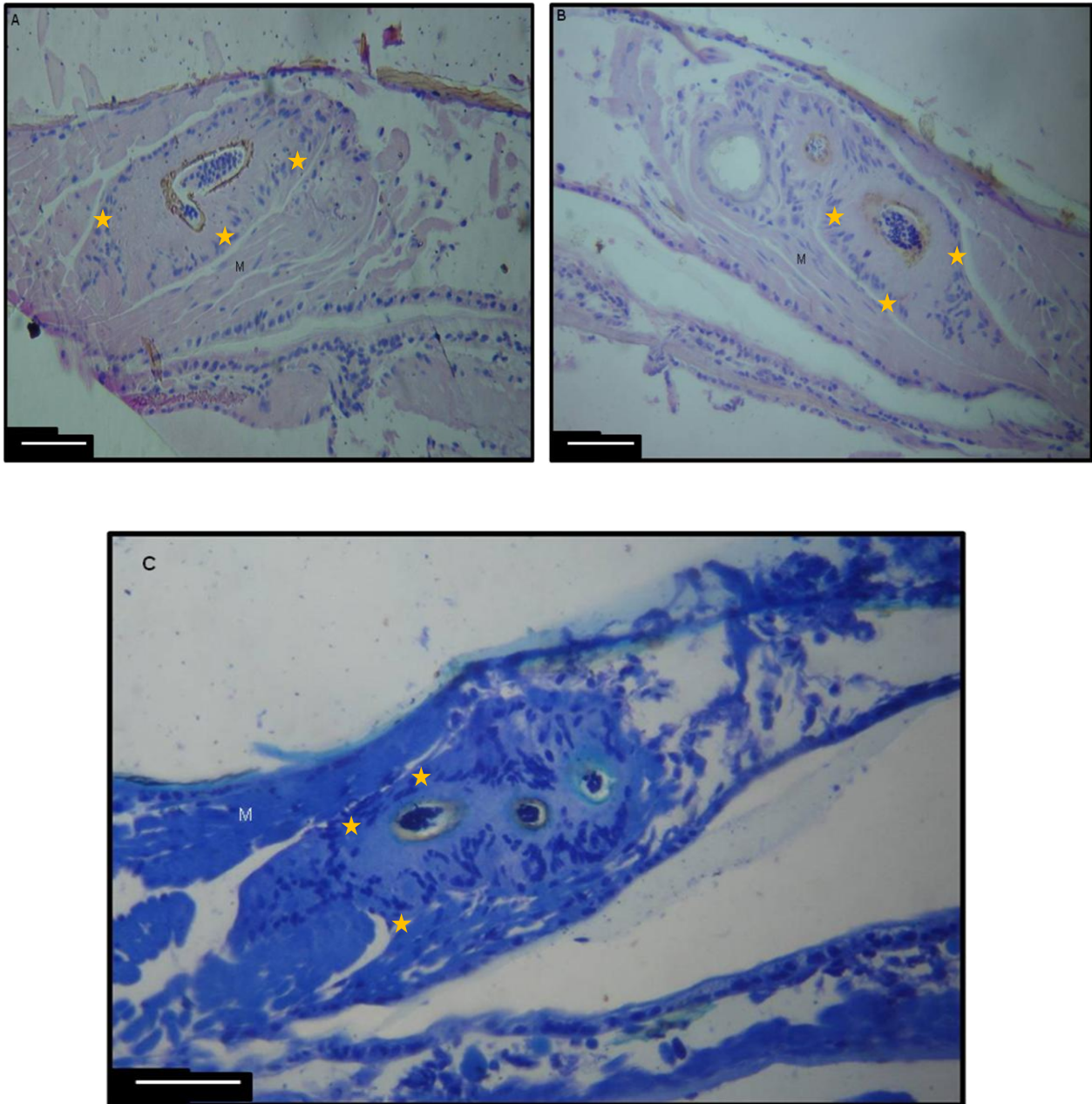


FIGURA 11 – Disposição das glândulas espermatecais, com núcleos basais (★) envolvidas por musculatura lisa (M). A, B – HE. C –AT, novamente mostrando reação negativa para o corante. Barra = 100µm.

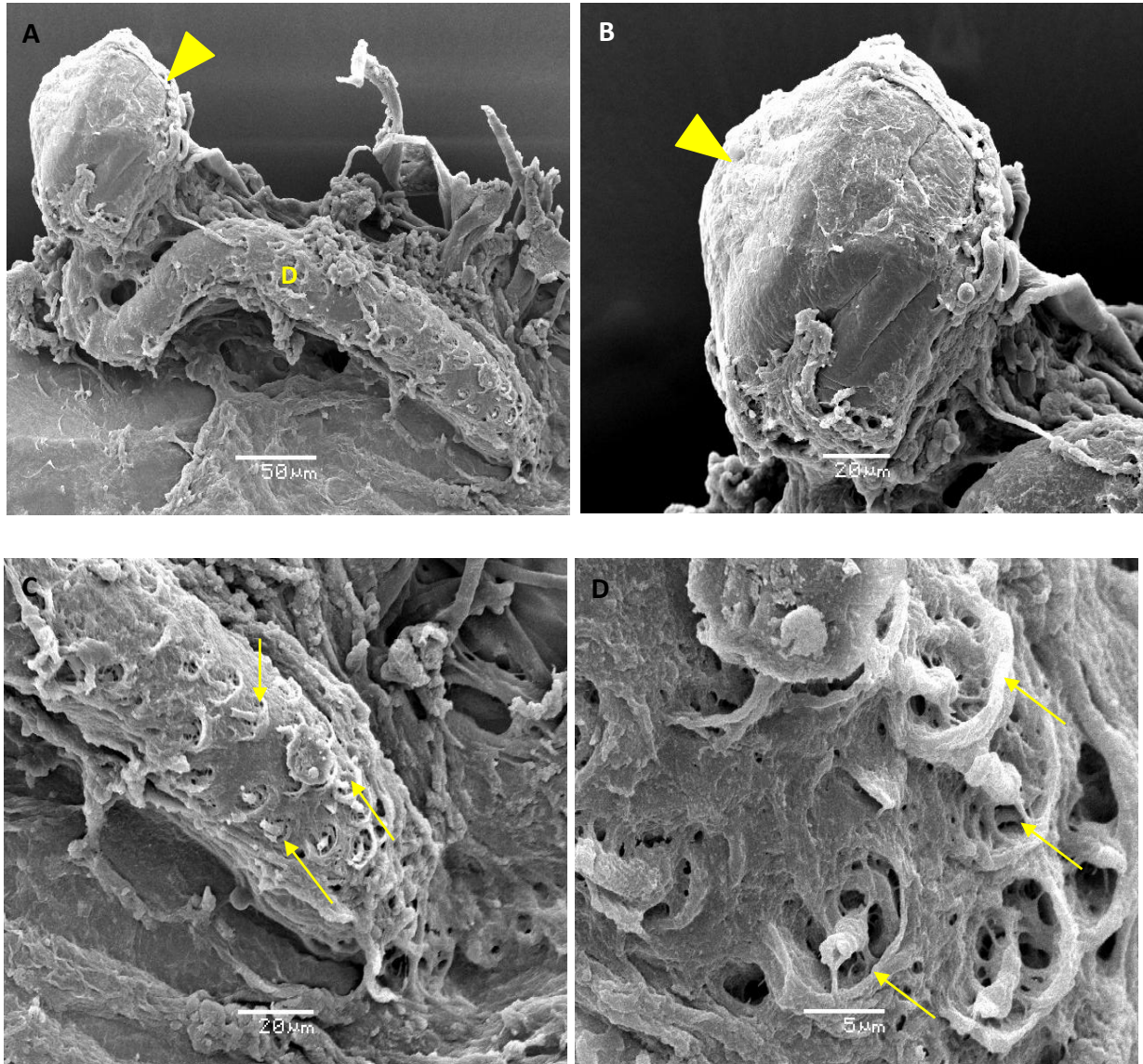


FIGURA 12. – Análise das espermatecas de *L. intermedia* em microscópio eletrônico de varredura. A – Visão geral da espermateca (cabeça de seta: bulbo; D: ducto). B – ausência de poros no bulbo. C – presença de poros no ducto (setas). D – Detalhe dos poros do ducto (setas).

6. DISCUSSÃO

O aparelho genital das fêmeas de *L. intermedia* apresenta a constituição típica de aranhas haplóginas: uma cavidade genital – útero externo ou bursa copulatrix – e duas espermatecas separadas espacialmente, do tipo fundo de saco, isto é, possuem apenas um único ducto o qual conecta o lúmen da espermateca com o útero externo, sendo, portanto, utilizado tanto para a entrada quanto para a saída de espermatozoides (Uhl, 1994).

As espermatecas do tipo fundo de saco, são uma evidencia morfológica de que os espermatozoides do último macho com o qual a fêmea copulou tem prioridade frente aos dos outros machos com os quais ela copulou anteriormente (Uhl, 2000). Segundo Ayub (2006), o modo de inseminação em *L. intermedia*, no qual o macho insere seus espermatozoides diretamente no lúmen das espermatecas, contribui para a mistura dos espermatozoides de diferentes machos que já copularam com a fêmea em questão, indicando que talvez a prioridade do último esperma não seja uma regra.

A morfologia externa das espermatecas de fêmeas de *L. intermedia* apresentou formato e dimensões variáveis entre os exemplares analisados, mas manteve a estrutura padrão. Esta consiste em dois ductos quitinizados, finos, sinuosos e separados entre si e, em seu ápice, apresentam uma estrutura ovalada e não quitinizada denominada bulbo, características que corroboram com os dados apresentados por Fischer (1996). No entanto, essa característica não é a regra. Segundo Coyle (1968; 1971) em aranhas do gênero *Antypoides* o bulbo apresenta uma parede espessa e cutícula escleritonizada.

Michalik e colaboradores (2005) dividem a espermateca de *Antrodiaetus unicolor* em três partes: o bulbo, a cavidade mediana (a qual corresponde à maior parte do ducto) e o tronco (região inicial, que desemboca no útero externo). Este autor descreve que apenas a região do ducto apresenta poros, através dos quais as células glandulares, que envolvem as espermatecas, liberam seu conteúdo no lúmen destas. No bulbo, entretanto, não foram observados poros e acredita-se que esta estrutura desempenhe uma função diferenciada. Sua parede fina e flexível, sem poros, atua na liberação dos espermatozoides, do lúmen da espermateca para o útero externo. A musculatura lisa que envolve a espermateca ao se contrair causa uma pressão negativa no interior do bulbo, comprimindo-o, e forçando que os

espermatozóides deixem a espermateca. Em *L. intermedia*, essa disposição dos poros (em toda extensão dos ductos e ausentes no bulbo) também foi observada, assim como musculatura lisa envolvendo as espermatecas, através da técnica de montagem total e microscopia eletrônica de varredura, pode sugerir que as diferentes regiões das espermatecas possuam funções específicas.

Segundo Uhl (2000), o tecido glandular que envolve as espermatecas das aranhas da espécie *Dysdera erythrina* é formado por unidades glandulares, sendo que cada unidade é formada por três células secretoras, separadas por células intercalares, que se unem formando um reservatório comum e três canais celulares, que se dispõem de modo a formar um único canal que desemboca no lúmen do ducto da espermateca. Neste trabalho, as células intercalares e os canais por onde as células secretoras liberam suas secreções não foram observadas pelas técnicas utilizadas, indicando que uma análise mais detalhada deve ser realizada para uma melhor compreensão sobre o tecido glandular e suas secreções de *L. intermedia*.

Os espermatozóides observados no interior da espermateca de *L. intermedia* estavam imersos em uma secreção, que segundo Costa-Ayub (2006) e análises histoquímicas realizadas no presente estudo, é de composição glicoprotéica básica. Uhl (1996) descreve que a secreção de *P. phalangioides* é composta por glicoproteínas e glicolípídeos, o que confere à secreção um aspecto viscoso. Essa autora afirma que a viscosidade da secreção espermatecel pode servir para reter os espermatozóides no lúmen das espermatecas, para posterior fecundação e evitar a dessecação da massa de espermatozóides.

A manutenção dos espermatozóides no interior do corpo da fêmea sempre foi atribuída à secreção espermatecal, no entanto, há muita discussão em torno do assunto. Trabalhos sobre a secreção espermatecal e composição química do esperma demonstram que os espermatozóides mantêm quantidades e composições diferentes de nutrientes no interior de suas capsulas e não haveria, portanto, necessidade dos espermatozóides obterem nutrientes do corpo da fêmea (Uhl, 1994 e Michalik et al., 2005). Segundo Uhl (1994), a secreção espermatecal é o substrato energético para a manutenção da matriz para manter os espermatozóides na posição específica dentro do trato genital.

Eberhard e Huber (1998) a secreção do macho e da fêmea se misturam durante a cópula, o que provoca em algumas alterações nessas secreções, a exemplo a descapsulação dos espermatozóides no interior do corpo da fêmea em

Leucauge mariana. Costa-Ayub (2006) demonstrou que ocorre alteração da secreção quando há mistura de esperma com a secreção espermatecal, em *L. intermedia*.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo geral a descrição anatômica e histológica da espermateca da aranha marrom *L. intermedia*.

Através dos experimentos e posteriores análises realizadas, as seguintes conclusões podem ser delineadas:

- As espermatecas são do tipo fundo de saco, com um ducto simples que leva e traz os espermatozóides, desembocando no teto do útero externo;
- São constituídas por dois ductos quitinizados, que partem de uma inserção única, horizontal também quitinizada. Os ductos são mais grossos em sua base, tornando-se afilados e sinuosos em seu comprimento. Em seu ápice, encontra-se bulbo e não quitinizado;
- Espermatozóides são encontrados em todo comprimento do ducto e também no bulbo;
- As espermatecas são envolvidas por células glandulares;
- A secreção espermatecal apresenta glicoproteínas básicas;
- Ductos apresentam poros em toda sua extensão enquanto o bulbo não apresenta. Suerindo uma função diferenciada para essas estruturas.
- Este trabalho constitui uma pequena contribuição para o conhecimento da genitália feminina de *L. intermedia*. Sendo assim, estudos mais detalhados são necessários para um melhor entendimento sobre as espermatecas.

8. REFERÊNCIAS

AUSTAD, S. N. Evolution of sperm priority patterns in spiders. In: Sperm competition and the Evolution of Mating Systems (Ed. By R. L. Smith), pp. 223-249. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1984.

CARLO, J. M. de. Anatomia Microscopica de las espermatecas de los Generos Grammostola y Acanthoscurria (Araneae, Theraphosidae). Physis. Buenos Aires, v. 32, n. 85. P. 343-350 noviembre 1973.

COSTA-AYUB, C. L. S. Estudo da espermatogênese e da morfologia dos espermatozoides da aranha marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae: Sicariidae), antes e após a transferência para o corpo da fêmea. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

COYLE, F. The mygalomorph spider genus *Atypoides* (Araneae: Antrodiaetidae). Psyche (Camb. Mass.), v. 75, p. 157-194, 1968.

COYLE, F. Systematics and natural history of the mygalomorph spider genus *Antrodiaetus* and related genera (Araneae: Antrodiaetidae). Bulletin of the Museum of Comparative Zoology. V. 141, p. 269-402, 1971.

EBERHARD, W. G.; HUBER, B.A., 1998. Courtship, copulation and sperm transfer in *Leucauge mariana* (Araneae, Tetragnathidae) with implications for the higher classification. Journal of Arachnology, 26: 342-368.

FISCHER, M. L. Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Aracnida: Loxoscelidae) e sua relação com o loxoscelismo ocorrente no município de Curitiba, Paraná, Brasil. Monografia (Bacharelado em Biologia) Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 1993.

FISCHER, M. L. Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae: Sicariidae), no Município de Curitiba, PR. 136 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

FISCHER, M. L. Biologia, Ecologia e Sistemática de Aranhas, 2000.

FOELIX, R. F. Biology of Spiders. 2. Ed. New York: Harvard Press, Cambridge, 1982.

GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). Bulletin of American Museum of Natural History. v. 136, n. 3, p. 177-178, 1967.

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

KOVOOR, J. Une source probable de pheromones sexuelles: les glandes tégumentaires de la region genitale des femelles d'araignées. Bulletin Society. Oscana Science Natural, v. 88, p. 1-15, 1982.

MANGILI, O. C. Perigo na teia. Ciência hoje. Curitiba, v. 33, n. 197. P. 42-57 set. 2003

MARQUES DA SILVA, E. Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832, no período de 1993 a 2000. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Ciências da Saúde, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2002.

MARQUES DA SILVA, E.; FISCHER, M. L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Paraná, v. 38, n. 4, p. 331-335, jul./ago. 2005.

MELLO-LEITÃO. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles lowe*. Anais Academia Brasileira de Ciências, v, VI, n. 2. Jun, 1934.

MICHALIK, P. Female Genitall System of the Folding- Trapdoor Spider *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) (Antrodiaetidae, Araneae): Ultrastructural Study of Form and Function with Notes on Reproductive Biology of Spiders. Journal of Morphology. v. 263, p. 284-309, 2005.

MORISHTA, R. Detecção da atividade da fosfatase alcalina durante as diferentes etapas do precosso de oogênese em *Loxosceles intermédia*. Monografia de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2000.

UHL, G. Ultrastructure of Acessory Glands in Female Genitalia of *Pholcus phalangoides* (Fusslin, 1775) (Pholcidae; Araneae). Acta Zoologica, v. 75, p. 13-25, 1994.

UHL, G. Two distinctly different sperm storage organs in female *Dysdera erythina* (Araneae: Dysderidae). Arthropod Structure & Development, v. 29, p. 163-169. 2000.

