

SIMONE APARECIDA FERREIRA

**ANÁLISE DOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
DA ARANHA MARROM “*Loxosceles intermedia*”**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Biologia Celular,
Departamento de Biologia Celular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cloris D. Faraco

CURITIBA
2001

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

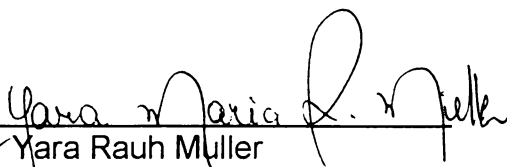
PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "ANÁLISE DOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DA ARANHA MARROM, *Loxosceles intermedia*.", de autoria da Pós-Graduanda Simone Aparecida Ferreira e composta pelos Professores: Profª Drª. Cloris Ditzel Faraco; (como Orientadora e Presidente da UFPR); Profª Drª. Yara Rauh Muller (UFSC); e Profª Drª Edith Susana Elisabeth Fanta (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Drª. Cloris Ditzel Faraco , nota 10,0 (dez); Drª. Yara Rauh Muller, nota 10,0 (dez); e Drª. Edi 10,0 (dez) nota 10,0 (dez). De acordo com o Regimento interno do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, a candidata foi: APROVADA com a nota 10,0 (dez), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas.

Em Curitiba, 23 de Novembro de 2001.



Drª Cloris Ditzel Faraco



Drª Yara Rauh Müller



Drª Edith Susana Elisabeth Fanta

**A mente que se abre a uma
idéia nova jamais voltará ao seu
tamanho original.**

(Albert Einstein)

À profª Drª CLORIS DITZEL FARACO

**Pela amizade, paciência, disposição,
confiança, companheirismo, pelas boas
idéias e, sobretudo, pela orientação
sempre presente e dedicada.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, representada pelo Magnífico Reitor Prof. Carlos Roberto Antunes dos Santos pela oportunidade de realizar este objetivo.

A todos os **professores** do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular pelos conhecimentos repassados em especial **Márcia Helena Mendonça, Edith Susana Fanta, Cláudio de Paula Soares Greca, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.**

Às **professoras Cecílinha, Claudia e Léa** pelo carinho e amizade.

À **professora Leimin Kou** pela ajuda e dedicação.

À **secretária Marlene** pela disposição com a qual sempre fui recebida pela amizade e incentivo.

Aos funcionários **Gerizalda, Mary, Eliane, Ana e Nino**, que sempre estiveram prontos a ajudar nessa jornada.

Ao técnico de informática **Paulo Henrique** pela boa vontade em sempre servir.

À amiga **Renata** pelas boas idéias, companheirismo, disposição e incentivo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À amiga **Fabiana** pela amizade franca e sincera, pelo companheirismo e incentivo.

À amiga **Sônia** por sua amizade, afeto e companheirismo em todos os momentos.

À amiga **Cristina** pelo incentivo e amizade.

À amiga **Carol** pelo bom humor

Às amigas **Marisa** pela serenidade

À amiga **Patrícia** pelo companheirismo.

A todo o **peçoal** do Laboratório de Embriogênese, que sempre tiveram presente em todos os momentos.

Às amigas **Viviane, Ana Raquel e Thaís** pelos bons momentos e pela amizade.

Aos amigos **Luis Fernando (Zão) e Marcelo (Paulista)** pelos momentos ímpares de descontração e pela amizade.

À colega de turma **Marion** cujo exemplo de amizade jamais esquecerei.

Aos meus tios **Abel e Lurdinha** pela acolhida, aos meus primos **Abel Jr e Carolina** pela convivência e pela paciência.

À **minha família**, aos meus pais, meus irmãos, minhas cunhadas e sobrinhas pelo carinho, companheirismo, e principalmente pelo incentivo nos momentos difíceis e que souberam entender os momentos de ausência.

O desenvolvimento deste trabalho não seria possível sem a colaboração, incentivo e credibilidade de inúmeras pessoas que estiveram presentes durante todo esse tempo.

Agradeço a todas estas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente: Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ARANHAS.....	01
1.2. LOXOSCELISMO NO PARANÁ	02
1.3. CARACTERÍSTICA DE <i>Loxosceles intermedia</i>	03
1.4.OVIPOSIÇÃO	04
1.5. CARACTERÍSTICAS DOS OVOS E ENVOLTÓRIOS	06
1.6. SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DAS ARANHAS	11
1.7.FECUNDAÇÃO E CLIVAGEM	12
1.8. ASPECTOS RELEVANTES NO ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE GRUPOS DE INTERESSE	24
1.9. OBJETIVOS	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 – MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
2.1. COLETA E ACASALAMENTO	28
2.2.OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES.....	29
2.3. FIXAÇÃO	30

2.4. PREPARAÇÃO PARA A MICROSCOPIA DE LUZ	30
2.5. OBTENÇÃO DOS CORTES E COLORAÇÃO	31
2.6. PREPARAÇÃO PARA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	31
2.7. PREPARAÇÃO PARA A MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	32
2.8 USO DA PARAFINA LÍQUIDA.....	32
2.9.USO DA FALOIDINA PARA A VISUALIZAÇÃO DA ACTINA CELULAR.....	32
2.10.RETIRADA DOS ENVOLTÓRIOS DOS OVOS.....	33
3. RESULTADOS	35
3.1.OBSERVAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO.....	35
3.2. CARACTERÍSTICAS DA OOTECA.....	35
3.3. OVIPOSIÇÃO E COLETA.....	37
3.4. DESENVOLVIMENTO NA PARAFINA LÍQUIDA.....	38
3.5. DESENVOLVIMENTO INICIAL.....	39
4. FIGURAS	45
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- 1) ILUSTRAÇÃO 01 – ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DAS ARANHAS.....06
- 2) ILUSTRAÇÃO 02 - DESENVOLVIMENTO TARDIO DAS ARANHAS DO ESTÁGIO DE INVERSÃO ATÉ PRÉ-LARVA23

LISTA DE TABELAS

- 1) TABELA 01- RELAÇÃO DO NÚMERO DE OVOS POR OOTECA.....36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. ARANHA MARROM MACHO E FEMEA DETALHE DA OOTECA.....	46
FIGURA 02. EMBRIÃO NA PARAFINA LÍQUIDA DETALHE GRÂNULOS DE VITELÓ.....	48
FIGURA 03. EMBRIÃO NA PARAFINA LÍQUIDA DETALHE NÚCLEOS DE CLIVAGEM	48
FIGURA 4. EMBRIÃO NA PARAFINA LÍQUIDA CÉLULAS DA BLASTODERME.....	48
FIGURA 05. EMBRIÕES NA PARAFINA LÍQUIDA ESPAÇO PERIVITELÍNICO.....	48
FIGURA 06. EMBRIÕES NA PARAFINA LÍQUIDA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO	50
FIGURA 07. EMBRIÕES NA PARAFINA LÍQUIDA DISCO GERMINATIVO	50
FIGURA 08. EMBRIÕES NA PARAFINA LÍQUIDA ESTÁGIO PRÉ-LARVA	52
FIGURA 09. EMBRIÕES NA PARAFINA LÍQUIDA ESTÁGIO DE PRÉ-LARVA DURANTE A ECLOSÃO.....	52
FIGURA 10. EMBRIÃO TRATADO COM PAS OBSERVAR GRÂNULOS DE GLICOGÊNIO E O CÓRION.....	54

FIGURA 11. IMAGEM DO CÓRION AO MICROSCÓPIO DE VARREDURA.....	56
FIGURA 12. IMAGEM DO CÓRION AO MICROSCÓPIO DE VARREDURA, OBSERVAR O ENVOLTÓRIO VITELÍNICO	56
FIGURA 13. CORTE DE EMBRIÃO CORADO COM AZUL DE TOLUIDINA OBSERVAR GRÂNULOS METACROMÁTICOS	54
FIGURA 14. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E. OBSERVAR VITELO E CITOPLASMA APICAL	58
FIGURA 15. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E. OBSERVAR DISPOSIÇÃO DO CITOPLASMA E DO VITELO	58
FIGURA 16. CORTE DO EMBRIÃO CORADO EM H.E. EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO	60
FIGURA 17. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E., DETALHE DO NÚCLEO NO CITOPLASMA CENTRAL	60
FIGURA 18. OVOS EM PARAFINA LÍQUIDA, OBSERVAR ARRANJO DO VITELO	62
FIGURA 19. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E., OBSERVAR O ARRANJO DO VITELO	62
FIGURA 20. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E., OBSERVAR RAIOS DE CITOPLASMA	64
FIGURA 21. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E, OBSERVAR NÚCLEOS EM DIVISÃO	66

FIGURA 22. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E, OBSERVAR ENVOLTÓRIO VITELÍNICO, DIVISÃO NUCLEAR E VITELO.....	66
FIGURA 23. CORTE DE EMBRIÃO EM H.E., CÉLULAS DA BLASTODERME.....	68
FIGURA 24. ULTRAESTRUTURA DA CÉLULA DA BLASTODERME	68
FIGURA 25. CORTE DE EMBRIÃO TRATADO COM PAS, OBSERVAR GRANULAÇÕES DO CITOPLASMA E ENVOLTÓRIO VITELÍNICO.....	70
FIGURA 26. IMAGEM DA CÉLULA DA BLASTODERME COM FALOIDINA	70
FIGURA 27. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E, OBSERVAR OS VITELÓCITOS.....	72
FIGURA 28. ULTRAESTRUTURA DOS VITELÓCITOS	74
FIGURA 29. ELETRONMICROGRAFIA DO EMBRIÃO, OBSERVAR A ULTRAESTRUTURA DOS ENVOLTÓRIOS	74
FIGURA 30. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E., MUTIPLICAÇÃO CELULAR APÓS A BLASTODERME	76
FIGURA 31. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E., OBSERVAR CONTRAÇÃO DA BLÁSTULA.....	76
FIGURA 32. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E., OBSERVAR CÉLULAS DO DISCO GERMINATIVO.....	78
FIGURA 33. CORTE DE EMBRIÃO CORADO EM H.E, OBSERVAR VÁRIAS DIVISÕES CELULARES	78

RESUMO

Devido ao aumento do número de casos de acidentes com aranhas-marrom, tem-se a necessidade de estudar os aspectos da embriologia de *Loxosceles*, para contribuir com a elucidação de seu grande sucesso reprodutivo e ampla distribuição. A fêmea de *Loxosceles intermedia* põe seus ovos em uma ooteca pequena com aproximadamente 1cm de diâmetro, de forma discóide, construído sempre ao abrigo da luz. Os ovos são esféricos e apresentam em média 1mm de diâmetro. São revestidos externamente por uma membrana fina e transparente, o córion. A fresco possuem uma cor branco-amarelada devida à grande quantidade de vitelo. Os ovos foram fixados em paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2% em tampão fosfato para a microscopia de luz e microscopia eletrônica, e em paraformaldeído 4% para a detecção da actina celular com uso de faloidina - TRITC. As mudanças ocorridas durante o desenvolvimento puderam ser observadas devido ao uso de parafina líquida, que não interferiu na dinâmica de desenvolvimento observado. Os ovos de *Loxosceles intermedia* são centrolécitos, ou seja, possuem uma massa granular de vitelo que ocupa quase toda a área do ovo enquanto, o citoplasma fica restrito a uma fina camada cortical e raios dirigidos para o centro. A clivagem é do tipo superficial, os núcleos começam a se dividir no centro e migram para periferia do ovo, e quando nesta localização vão constituir a blastoderme sincicial, a seguir começam a se definir os limites celulares e forma-se então a blastoderme celular. A blástula formada sofre uma contração, com diminuição de tamanho dos blastômeros e migração deles para uma região enquanto o vitelo, que sofre grande rearranjo ocupa todo o restante do ovo. Os blastômeros passam então a formar o disco germinativo em que ocorre a formação dos folhetos germinativos.

ABSTRACT

The increase of accidents caused by brown spiders raised the interest on the embryology of *Loxosceles intermedia*, and the need of studies in order to contribute to elucidate their ample distribution and the great reproductive success of this species. *Loxosceles intermedia* females lay their eggs in a sac-like, discoid shaped cocoon, with an average medium diameter of 1cm, always made protected from light. The eggs are spheric with a diameter of 1mm, externally coated by a thin and transparent membrane, the chorion. Newly laid eggs have a white-yellowish color, due to the great amount of yolk. Eggs were fixed in 2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in phosphate buffer for light and electron microscopy, and 4% paraformaldehyde for cellular actin detection with phalloidin-TRITC. The changes occurring in the course of development were observed in liquid paraffin that showed to be efficient, because it does not interfere on the observation of the developmental dynamics. *Loxosceles* eggs are centrolecithal with a granular yolk mass distributed throughout the egg, being the cytoplasm restricted to a thin cortical layer and strands running towards the center. The cleavage is superficial, the nuclei start to divide in the center of the egg, and then migrate to the periphery to constitute the syncytial blastoderm. After that, the cell limits are formed and the cellular blastoderm is established. The blastula undergoes a process called contraction with the migration of the blastomeres that become smaller to one region while the yolk accumulates at the opposite side. The blastomeres form then the germ disk where the formation of embryonic layers starts.

INTRODUÇÃO

1) CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ARANHAS

As aranhas podem ser classificadas pelo seu tamanho, cor, marcas no corpo, assim como pela disposição dos olhos e estruturas reprodutivas. O corpo da aranha é dividido em duas partes distintas, a porção anterior é chamada de prossoma ou cefalotórax e a porção posterior de opistossoma ou abdome. Estas porções são conectadas por um estreito pedúnculo, o pedicelo. As funções do prossoma são principalmente de locomoção, obtenção de alimento e para a integração do sistema nervoso. O opistossoma cumpre principalmente funções vegetativas, como digestão, circulação, respiração, excreção, reprodução e produção de seda. O prossoma é coberto por uma placa dorsal e outra ventral, a carapaça e o esterno, respectivamente. O encontro destas duas placas forma o local de conexão para os seis pares de extremidades: um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas. Nos machos maduros os pedipalpos são modificados em órgãos copulatórios, e esta característica não é encontrada em nenhum outro artrópodo. Em contraste com o prosoma robusto, o abdome é delicado e em forma sacular, possuindo fiandeiras na sua porção posterior (Foelix, 1982). Atualmente existem 34.000 espécies de aranhas descritas e agrupadas em aproximadamente 100 famílias. Elas estão distribuídas por todo o mundo, conquistando todos os ambientes, exceto o ar e mar aberto. A Ordem Aranae é usualmente dividida em três sub-ordens, *Mesothelae*, *Mygalomorphae* e *Araneomorphae*, sendo esta uma das várias classificações existentes para o grupo. Dentro da subordem Araneomorphae

encontram-se 32.000 espécies em 2.700 gêneros, agrupados em famílias, entre elas a família Sicariidae, à qual pertence o gênero *Loxosceles* (Foelix, 1982). Este gênero é de distribuição cosmopolita, com cerca de 30 espécies para a América do Sul sendo que sete delas estão no Brasil e do ponto de vista epidemiológico e de saúde pública destacam-se as aranhas *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles intermedia* (Lucas S., 1983/84; Fischer, 1994).

2) LOXOSCELISMO NO PARANÁ

Os acidentes ocasionados pela picada da aranha *Loxosceles* no Brasil, começaram a ser reconhecidos a partir de 1954, mas não são freqüentes, com exceção dos ocorridos no Estado do Paraná, particularmente Curitiba e região metropolitana. No período de 1988-89 foram 595 casos, os quais corresponderam a 62,5% das notificações de acidentes por *Loxosceles spp* sendo a espécie predominante é *Loxosceles intermedia*. Entre 1989 e 1990 o total de casos chegou a 923, perfazendo 77,4 dos acidentes no País, com incidência maior nos períodos mais quentes do ano. Em 1994, foram registrados 2.428 casos em Curitiba, com três óbitos. Em 1996 2.193 foram casos registrados porém, não foi registrado nenhum óbito. No Paraná o loxoscelismo, comparado com outros acidentes toxicológicos provocados por animais peçonhentos, ocupa o primeiro lugar com 58,1% dos casos. Os acidentes com as aranhas do gênero *Loxosceles* se relacionam aos hábitos adotados pela mesma e tendem a ocorrer principalmente em pessoas do sexo feminino, e os locais mais afetados são as regiões proximais dos membros inferiores e superiores e no tronco, caracterizando o acidente doméstico, ocasionado principalmente pelo ato de defesa da aranha ao ser comprimida contra o corpo do

indivíduo, durante o sono ou no momento de vestir-se (dados fornecidos pelo Centro de Epidemiologia do Paraná).

3) CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Loxosceles intermedia*

A espécie de aranha-marrom predominante no município de Curitiba, *Loxosceles intermedia*, pode ser classificada por um conjunto de características, como sua coloração marrom-avermelhada, tamanho médio de 4 cm, poucos pêlos no corpo, pernas longas e finas, seis ocelos noturnos homogêneos em três díades em linha recurva, e fenda genital simples, isto é, abertura sem presença de placa esclerotizada sobre os orifícios genitais, característica de aranhas haplóginas. Outras características também são utilizadas para classificar esta espécie, como a disposição dos pêlos na região cefálica, forma e sulcos limitantes laterais menos curvos desta região, e a relação entre a distância dos olhos posteriores à borda lateral e à linha mediana (Mello-Leitão, 1934). Os receptáculos seminais em *Loxosceles* constituem um importante caráter na identificação das espécies, sendo que a genitália da *Loxosceles intermedia* é caracterizada por dois a quatro receptáculos seminais, muito separados um do outro (Buckup 1980; Fischer, 1994). A quantidade de receptáculos seminais e a capacidade de armazenar os espermatozóides podem estar relacionadas com a fecundidade dessas aranhas. A morfologia das fiandeiras é utilizada para a determinação da filogenia de aranhas haplóginas, que inclui a família Sicariidae, sinônimo de família Loxoscelidae para Platnick et al (1991). Estas aranhas não são agressivas, são solitárias, sedentárias, com hábitos noturnos e constroem teias de fios brancos dispersos irregularmente, semelhantes ao algodão. Preferem a escuridão, vivem sob rochas e troncos de

árvores. O homem lhes proporciona habitats adequados à sobrevivência tais como garagens, sótãos, despensas, adegas, paredes divisórias. No interior das casas habitualmente se encontram atrás de quadros, móveis, caixotes, nos cantos e em roupas colocados próximas às paredes (Schenone & Letonja 1975). Seus predadores naturais são lagartos, lagartixas, sapos e galinhas. Os ovos das aranhas são normalmente colocados dentro de uma massa de fios de seda que é chamada de casulo ou ooteca. Existem grandes variações na forma e maneira de construção dessas ootecas, que têm por função abrigar e proteger os ovos nela contidos e impedir sua dessecação.

4) OVIPOSIÇÃO

As fêmeas de *Loxosceles intermedia* iniciam a construção da ooteca com a confecção do piso, formado por fios de seda finos, presos ao substrato. Movimentam-se em círculo, direcionando o abdome da periferia ao centro, unindo pontos radiais. Depois de pronta a ooteca, a fêmea posiciona-se verticalmente e inicia a desova. Cerca de 30 minutos depois, assim que a desova termina, o conjunto toma o aspecto granular, a imagem de cada ovo individualiza-se e a fêmea passa a construir o teto de forma semelhante ao piso. Cada ooteca apresenta 18mm de diâmetro aproximadamente, e estas são construídas em lugares escuros e com uma média de 49,53 ovos (Fischer, 1997). Galiano (1967) relata para a aranha *Loxosceles laeta*, que em condições laboratoriais sua ooteca apresenta características semelhantes às da *Loxosceles intermedia*. Os filhotes emergem em 24-36 dias e abandonam a ooteca. O desenvolvimento é lento, e parece ser influenciado pela temperatura, umidade e disponibilidade de alimento. As aranhas alcançam a maturidade

aproximadamente em um ano e podem sobreviver por longos períodos sem comida e água.(Fischer, 1997).

Dados sobre a biologia reprodutiva de *Linothele megatheloides* revelam que a época de reprodução dessa aranha coincide com aumento da umidade ambiental, pois quando aumentam as chuvas é possível encontrar suas ootecas. A média de ovos por ooteca é de 161 e cada ovo tem em média 2,2 mm. As fêmeas grávidas constroem a ooteca como se fosse uma rede, depositam primeiro um líquido claro bastante viscoso e iniciam a oviposição. Quando esta é concluída a aranha começa a tecer o teto da ooteca dando-lhe a forma de uma câmara. Essas aranhas costumam cuidar de sua ooteca como é observado em outras espécies. As aranhas jovens emergem da ooteca, mas permanecem em seus arredores até ocorrer a 2ª muda, a partir deste momento começam a construir pequenas teias e a partir da 3ª muda começam a individualizar-se e ter comportamento agressivo, sendo necessário separá-las em grupos menores para evitar o canibalismo. Os machos dessa espécie atingem sua maturidade sexual entre a 9ª - 10ª mudas, quando seu pedipalpo transforma-se em gonopódio (Paz, 1993).

A ontogenia das aranhas pode ser dividida em três períodos: embrionário, larval e ninfo-imaginário. O período embrionário abrange o desenvolvimento do ovo fertilizado até que as formas típicas do corpo são estabelecidas. No período ninfo-imaginário possuem todos os órgãos e sistemas, são auto-suficientes, diferindo dos adultos por serem sexualmente imaturos (Foelix, 1982).

Segundo Galiano (1967) o desenvolvimento pós-embrionário compreende desde o momento da eclosão na forma de pré-larva (estágio A), a primeira muda (estágio B de pré-larva), nova muda em que passa para o estágio C de larva, e no

seguinte estágio I chamado primeira ninfa. Todas essas mudanças ocorrem dentro da ooteca e são chamados de estágios incompletos. Depois do estágio I as aranhas jovens saem da ooteca. Os estágios subseqüentes, estágio II, segunda ninfa, estágio III, terceira ninfa, até o adulto, ocorrem fora da ooteca e são chamados estágios completos de desenvolvimento.

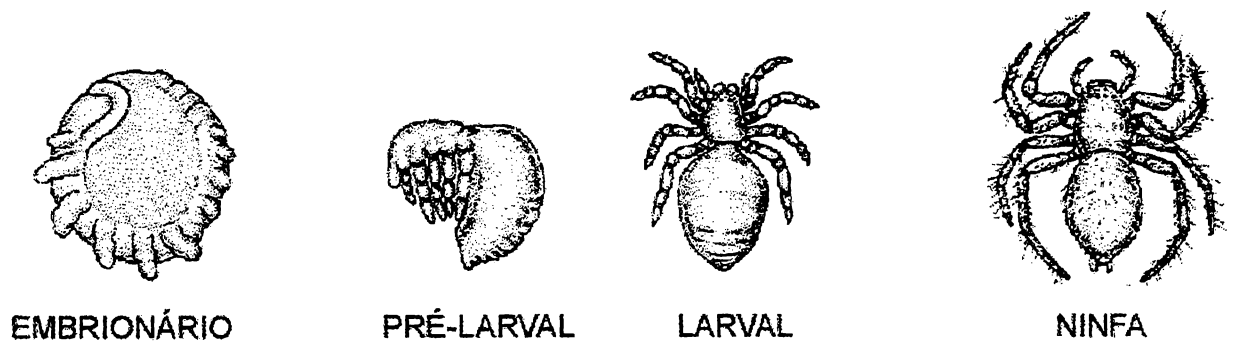


Ilustração 01 – Estágios de desenvolvimento de aranhas. (FONTE: Gilbert e Raunio 1997).

5) CARACTERÍSTICAS DOS OVOS E ENVOLTÓRIOS

Os ovos das aranhas são envolvidos por duas camadas: uma interna, a membrana vitelínica e uma externa, o córion (Foelix, 1982). Os ovos de *Epeira cinerea* são ligeiramente elípticos, com mais ou menos 1mm de diâmetro, grande parte do ovo consiste no vitelo que é separado por finas camadas de citoplasma que irradiam para o centro do ovo, e uma fina camada de citoplasma fica na superfície do ovo e forma o periplasma. O ovo é revestido por duas membranas, uma interna fina, que fica em contato com o periplasma que é a membrana vitelínica e outra externa

de aparência granular, o córion. O autor supõe que ambas as membranas são secretadas pelo oviduto (Lambert, 1909).

Observações realizadas em ovos de *Achaearanea japonica* revelaram que a camada principal da membrana vitelínica é pouco eletrondensa, contendo fibrilas abaixo da camada externa (Suzuki & Kondo, 1994). Ainda há poucas informações detalhadas sobre a constituição e origem da membrana vitelínica. Rempel (1957) sugere que a membrana vitelínica controle a entrada do espermatozóide no ovo visto que o espermatozóide pode passar livremente através do córion. Suzuki & Kondo (1994) sugerem que a membrana vitelínica muda sua constituição no processo de formação de membrana de fertilização. Apesar de muitos espermatozóides serem capazes de ligarem-se ao óvulo, normalmente um funde-se à sua membrana plasmática, injetando seu núcleo e outras organelas no citoplasma do óvulo. Se mais de um espermatozóide fundir-se ocorre uma situação denominada poliespermia (Alberts et al., 1997). Há várias estratégias que bloqueiam a poliespermia, dependendo da espécie estudada. Algumas espécies adotaram a seguinte estratégia: na membrana que reveste o ovo existe um local que contém um pequeno orifício, chamado micrópila que serve para deixar que o espermatozóide entre dentro do ovo. Assim que ele entra essa micrópila se fecha. (Browder et al., 1991). A membrana do óvulo deve estar apta para se fundir com a membrana do espermatozóide, mas precisa perder esta propriedade imediatamente após a entrada do primeiro espermatozóide. O bloqueio rápido à poliespermia se dá mudando o potencial da membrana do óvulo, evitando assim a entrada de outros espermatozóides (Gilbert, 1994). Em ouriços do mar, por exemplo, assim que o espermatozóide entra no óvulo, é liberado simultaneamente o conteúdo dos

grânulos corticais que se fundem com a membrana plasmática. Mudanças moleculares e osmóticas ocorrem, o envoltório vitelínico passa a ser chamado de membrana de fertilização e devido às alterações sofridas impede a interação de outros espermatozóides com ovócito (Browder et al., 1991; Gilbert, 1994).

A fertilização de *Latrodectus manctans* ocorre aproximadamente 3 a 4 horas após a oviposição. A poliespermia é comum em aranhas, porém nessa espécie não foi encontrado mais de um espermatozóide no citoplasma do ovo, vários foram encontrados entre o córion e a membrana vitelínica. Logo a membrana vitelínica exerce um controle da entrada dos espermatozóides permitindo que apenas um entre e efetue a fertilização (Rempel, 1957).

Nos ovos de *Lytta viridana* (Coleóptera: Miloidae), a estrutura da membrana vitelínica sob a microscopia de luz é de uma camada fina com poros, condição essa que permanece de 15-30 minutos após a oviposição. A partir deste momento os poros vão ficando cada vez menores e depois de 1h a membrana vitelínica tem um aspecto uniforme. Sob a microscopia eletrônica ela se apresenta como três membranas dispostas mais ou menos paralelas ao córion, exceto quando essa membrana se dirige ao interior do periplasma. O autor chamou essa disposição de sistema complexo membranoso tridimensional. Após 15 a 30 minutos, os ovos passam a exibir a membrana vitelínica como uma camada única, sólida e eletrondensa (Gerrity, et al., 1967).

Estudos baseados em microscopia de varredura revelaram que a membrana que forma o córion de várias espécies de aranhas é constituída de várias estruturas esféricas com diâmetro médio de aproximadamente 1.0 μm e estas podem variar o padrão de acordo com a espécie estudada. Assim podem ser ordenadas em uma

densa camada separando as esferas e fortemente aderidas à superfície do córion, ou podem ainda ter camadas adicionais com algumas esferas podendo ser encontradas dispersas sobre o ovo ou em camadas mais profundas. A maioria das esferas encontradas são lisas, mas em algumas famílias estas podem apresentar superfície rugosa. As esferas estão apoiadas numa matriz eletrondensa (Humphreys, 1983). Este aspecto esférico do córion também é observado na aranha *Lyssomanes viridis*: as esferas são lisas e estão dispostas em várias camadas apresentando tamanhos variados.(Cutler, 1990).

Os revestimentos dos ovos de *Drosophila sp* são constituídos por três camadas protéicas: uma camada externa e uma camada interna do córion, e membrana vitelínica. As proteínas que compõem estas camadas são sintetizadas e secretadas durante a oogênese pelas células epiteliais foliculares que rodeiam o ovócito maduro (Pascucci et al. 1996). Sob a microscopia de varredura o córion dos ovos de *Drosophila* apresenta na camada externa uma cobertura que possui alguns sulcos de contorno hexagonal que parecem formar uma rede e na camada interna há uma série de estruturas colunares. Entre estas estruturas há muitas cavidades cheias de ar. (Turner & Mahowald, 1976).

No momento da oviposição os ovos do coleóptero *Lytta viridana* são colocados junto com uma substância de secreção mucilaginosa. Antes da fixação o córion é uma estrutura lisa, brilhosa e transparente. O córion parece ser constituído por apenas uma camada e está localizado muito perto da membrana vitelínica sendo dela separado por um espaço de aproximadamente 100 a 150 Å. Este espaço contém uma substância homogênea pouco eletrondensa. Este material é visível tanto em ovos recém postos quanto em estágios mais avançados de

desenvolvimento. Não ocorrem mudanças na estrutura do córion desde a postura e enquanto se dá o desenvolvimento embrionário (Sweeny et al., 1967).

Os ovos da aranha *Latrodectus mactans* apresentam-se esféricos, o córion é uma camada fina e elástica, e a membrana vitelínica é fina e transparente, situada logo abaixo do córion. Durante as primeiras horas após a oviposição o córion está bem aderido à membrana vitelínica, porém à medida que o desenvolvimento prossegue esta condição não é mais verificada. Por esta razão fica mais fácil a retirada do córion a partir de algumas horas após a oviposição.

No momento da oviposição os ovos estão envolvidos por um material de consistência mucosa deixando um ovo fortemente aderido ao outro. Esse fluido é fino e delicado e contém numerosas partículas em suspensão. À medida que ocorre desenvolvimento esse fluido vai evaporando e os grânulos vão aderindo junto ao córion. (Rempel, 1957).

Os insetos que pertencem à ordem Phastodea são caracterizados pela presença de revestimentos altamente resistentes. As membranas que revestem os ovos desse grupo são a membrana vitelínica e o córion, ambas sintetizadas pelas células foliculares. Ao final da vitelogênese a membrana vitelínica aparece como um material eletrondenso disposto alternadamente com material elétron translúcido, entre os curtos microvilos dos ovócitos. Mazzini et al., (1993), sugere que o revestimento dos ovos desse grupo possui o córion subdivido em cinco camadas. Relacionadas com a formação do córion, aparecem no citoplasma das células foliculares, vesículas contendo grânulos eletrondensos, dispersos em uma matriz filamentosa. Os ovos de *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera, Acrididae) apresentam uma membrana vitelínica, o córion e uma camada acima do córion, chamada de

“extracórion” que apresenta dois componentes distintos tanto na aparência quanto na composição química. Um desses componentes é de natureza amorfa e mucosa fina e vai desaparecendo algum tempo depois que o ovo é posto. O outro componente é quase inteiramente constituído de grânulos proteínáceos imersos no primeiro componente descrito acima. O autor sugere que o termo extracórion seja indicado para as capas que recobrem os ovos de diferentes espécies de animais e que são sintetizadas fora do ovário ou em qualquer parte do trato genital, como por exemplo as glândulas pseudocolaterais. Já para os constituintes sintetizados pelas células foliculares e no interior do oviduto sugere que seja usado o termo epicórion. (Viscuso et al, 1984).

6) SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DAS ARANHAS

As fêmeas de aranhas possuem dois ovários localizados na parte ventral do abdome. Cada qual se conecta a um oviduto que converge para formar um tubo mediano até se juntar à vagina. Associados ao útero e vagina se encontram os receptáculos seminais que são estruturas especializadas no armazenamento do esperma (Barner & Ruppert, 1996). O sistema reprodutor de uma espécie de escorpião foi descrita por Warburg (1992), com estruturas semelhantes à de *Loxosceles*, com ovócitos de diferentes tamanhos conectados à face ventral do epitélio ovariano por pedúnculos e que quando maduros são liberados deixando uma cicatriz no oviduto, porém o destino dos ovócitos não foi descrito. Valente (1984) descreve a oogênese e a estrutura anátomo-histológica do sistema genital feminino da aranha *Ramphobeteus sorocabe* (Araneae, Aviculariidae), e sugere que os ovócitos passem para dentro do lúmen ovariano de onde eles chegam até oviduto, e

daí até a vagina, sendo eliminados para o exterior através da fenda genital. Neste estudo não foram ressaltados aspectos sobre a oviposição e fertilização.

O sistema reprodutor feminino de *Loxosceles intermedia* é constituído por dois ovários alongados, com ovócitos presos ao oviduto por um conjunto de células do epitélio ovariano, o pedúnculo. Os dois ovidutos correm paralelos em direção à parte anterior do abdome, e nesta área se unem formando uma bolsa única, o útero. Provavelmente esta estrutura possui conexões com os receptáculos seminais e com a abertura genital (Morishita, 2000).

Ainda faltam muitos dados sobre a biologia reprodutiva de *Loxosceles intermedia*, como, por exemplo, dados sobre anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor masculino, estudo sobre a oviposição e fertilização, desenvolvimento embrionário, pós-embrionário, etc.

7) FECUNDAÇÃO E CLIVAGEM

Em geral a fertilização nas aranhas é considerada interna. O espermatozóide estocado no receptáculo seminal da fêmea é posto junto aos ovos no momento da oviposição. Entretanto o mecanismo pelo qual o espermatozóide é incorporado ao ovo ainda é desconhecido (Suzuki, 1995). Em *Achaearanea japonica* quando ocorre a oviposição observou-se a presença de núcleo espermático localizado perto da periferia, aproximadamente a 50 μ m da superfície do ovo (Suzuki & Kondo, 1994). Em *Theridium* a fusão dos núcleos do gameta feminino e do espermatozóide foi observada três a quatro horas após a oviposição (Montgomery Jr., 1909).

Os ovos de aranhas são do tipo centrolécito. Estes ovos caracterizam-se por possuírem o vitelo abundante de localização central, enquanto o citoplasma se

distribuí periféricamente e projeta raios para o centro do ovo (Garcia e Garcia, 2001). O vitelo é uma adaptação evolutiva que capacita um embrião a se desenvolver na ausência de uma fonte alimentar. Pode influenciar o padrão de clivagem de uma espécie, juntamente com outros fatores. (Gilbert, 1994). O padrão central da disposição do vitelo também é apresentado por outros grupos de artrópodos, por insetos e crustáceos como, por exemplo, ovos de *Macrobrachium acanthurus* (Crustácea, Decapoda), (Bressan & Muller, 1997).

A maior parte dos ovos de insetos passa por clivagem superficial, tipo de clivagem em que as células se formam somente após os núcleos terem se dividido muitas vezes. O núcleo do zigoto sofre várias divisões mitóticas dentro da porção central do ovo. Estes núcleos migram para a periferia do ovo e continuam a se dividir, embora em ritmo mais lento, sendo cada núcleo rodeado por um citoplasma comum. O conjunto neste momento é chamado de blastoderme sincicial. À medida que prossegue o desenvolvimento se dá o processo de celularização e a formação da blastoderme celular. (Gilbert, 1997). Este mecanismo de clivagem também é observado em outros grupos de artrópodes como crustáceos, ácaros e aranhas. O tempo requerido para formação da blastoderme pode variar de acordo com a espécie estudada.

Em *Drosophila* quinze minutos após a entrada do espermatozóide se forma o zigoto e a primeira divisão nuclear ocorre no interior do ovo. As divisões nucleares ocorrem sincronizadamente a cada 10 minutos aproximadamente. Durante as sete primeiras divisões os núcleos são rodeados de citoplasma. (Turner & Maholwald, 1976). Os núcleos e suas "ilhas citoplasmáticas" são chamadas de enérgides e os seus domínios são mantidos graças aos microfilamentos e microtúbulos. (Wolf,

1978; Gilbert, 1997). Todas as espécies eucarióticas possuem actina. Essa proteína do citoesqueleto é a mais abundante, constituindo, freqüentemente, 5% ou mais do total das proteínas celulares. Os filamentos de actina podem formar estruturas estáveis ou lábeis nas células. Muitos movimentos celulares, no entanto, dependem das estruturas lábeis constituídas a partir dos filamentos de actina (Alberts et al, 1997). Há dois grupos de substâncias que são amplamente utilizadas para estudar o comportamento da actina nos processos celulares, as citocalasinas que são drogas extraídas de fungos impedem a polimerização dos filamentos de actina porque se ligam na extremidade “mais” do microfilamento. As faloidinas são drogas extraídas do cogumelo *Amanita sp* e impedem a despolarização. Derivados fluorescentes são usados para corar os filamentos de actina tanto em células fixadas quanto em células vivas (Cooper, 1987). Os ovos de *Bombix mori*, quando incubados com citocalasina B, revelaram que a proporção de migração da enérgides tornou-se mais lenta e as mudanças morfológicas das microprojeções das células da blastoderme foram inibidas. Esses resultados sugerem que a mudanças morfológicas na superfície do ovo durante a formação da blastoderme são também controladas pelos microfilamentos (Takesue et al., 1985). A actina está presente desde as primeiras divisões da clivagem e participa da formação da blastoderme, pois através do seu arranjo difuso radial nas células pode causar a expansão na celularização da blastoderme (Warn & Margrath, 1983).

Em embriões de *Drosophila sp* a distribuição da actina e tubulina participam ativamente dos movimentos celulares e na formação da blastoderme sincicial. Durante os primeiros ciclos de clivagem elas estão retidas junto aos núcleos que estão migrando. Mas quando começa a se formar a blastoderme há uma

reorganização evidente em todo o citoesqueleto. Os microtúbulos aparecem nas regiões corticais e parece que auxiliam na formação de uma rede extensiva ao redor de cada núcleo. Um arranjo de actina parece revestir cada núcleo quando eles chegam a superfície (Karr & Alberts, 1986).

Em *Drosophila* na nona divisão os núcleos começam a migrar para a superfície do ovo enquanto simultaneamente ocorre um deslocamento do vitelo para a região central do ovo e organelas citoplasmáticas migram para a periferia. A formação da blastoderme celular a partir do blastema sincicial ocorre aproximadamente trinta minutos após iniciado o processo de divisão (Turner & Maholwald, 1976). O termo blastema sincicial foi substituído posteriormente por blastoderme sincicial (Gilbert, 1997).

Durante a embriogênese de abelhas o processo pelo qual é formado a blastoderme consome 40% do tempo entre a oviposição e a eclosão, portanto é considerado um período bastante longo. A clivagem compreende várias fases sucessivas. Cada fase ocorre num local chamado centro de diferenciação que está localizado na porção anterior do ovo, os núcleos que sofrem clivagem dirigem-se para os pólos do ovo. Sete horas após a oviposição os núcleos atingem o periplasma e surgem microvilos na superfície das células marcando o início da formação da blastoderme. Após 20 h as “enérgides da blastoderme” assim chamadas pelos autores, adquirem a forma colunar e 30 h após a blastoderme está formada (Fleig & Sander, 1985).

No desenvolvimento embrionário de *Bombyx mori*, bicho da seda, a blastoderme se forma 9 – 10 h após a oviposição e, quando os núcleos atingem a superfície do ovo esta apresenta inúmeras microprojeções. Neste animal não há a

formação da blastoderme sincicial. Os núcleos associados com seu citoplasma circundante ao chegarem na periferia empurram o periplasma e imediatamente ocorre a associação do periplasma com o citoplasma do núcleo e começa a se formar a célula da blastoderme propriamente dita (Takesue S. et al, 1980).

Entretanto no desenvolvimento embrionário de *Ephemera japonica* um inseto que pertence à ordem Ephemeroptera, 5 a 6 horas após a oviposição ocorre a formação do zigoto e a fertilização é completada. Aproximadamente 10h após ocorre a primeira clivagem, sendo que as outras clivagens ocorrem num intervalo de aproximadamente 9 horas e as cinco primeiras são sincronizadas. Após a sexta clivagem muitos núcleos já estão presentes no periplasma. Na oitava clivagem forma-se a blastoderme sincicial, neste estágio começam a aparecer membranas celulares e então se completa a blastoderme (Tojo & Machida, 1998). Em *Lepidocampa weberi* (Hexapoda) todo o período de desenvolvimento leva em torno de treze dias, sendo que três dias após a oviposição ocorre a formação da blastoderme (Ikeda & Machida, 1998).

Em ovos de *Ctnolepisma lineata* (Thysanura, Lepismatidae), ocorrem as três primeiras divisões da clivagem de 4 – 6 horas após a oviposição e estas divisões são bem sincronizadas. A partir da quarta divisão da clivagem essa sincronia vai desaparecendo. Após 12 a 16 horas as células atingem a periferia do ovo e completa-se a blastoderme (Woodland, 1957).

Em *Pedetontus unimaculatus* (Hexapoda: Microcoryphia, Machilidae), os ovos apresentam um padrão diferenciado de clivagem. A clivagem nos primeiros estágios é holoblástica ou total. A primeira divisão de clivagem ocorre 11 a 12 horas após a oviposição. Quando se atinge 250 – 500 núcleos não há mais divisão citoplasmática

exceto na periferia do ovo, quando ocorre a transição de clivagem total para a clivagem superficial. Esses núcleos que estão na periferia se dividem mitoticamente com divisões radiais e quando se atinge 1000 núcleos aproximadamente, tem-se a formação de uma membrana interna entre o vitelo e a blastoderme (Machida R, et al., 1990).

Os ovos de *Macrobrachium carcinus* (L.) (Malacostraca, Decapoda, Natantia) são centrolécitos e a segmentação é do tipo superficial até estágio de 16 células. Entre os estágios de 16 a 32 células, estas se apresentam totalmente separadas, como na segmentação total. Entre 64 e 128 células não se visualizam os limites celulares e o desenvolvimento embrionário segue o modelo de segmentação superficial (Müller, 1984).

O desenvolvimento embrionário de ácaros foi caracterizado por apresentar duas divisões, uma total e equitativa que é seguida por uma clivagem superficial. A parafina líquida mostra ser vantajosa para a observação contínua do desenvolvimento embrionário de ácaros, pois os ovos se desenvolveram até a eclosão quando mergulhados neste meio. Esta metodologia permitiu observar que em ácaros as divisões da clivagem aconteceram a cada hora até o estágio de 128 células. As divisões iniciais são totais e iguais. A partir da terceira divisão elas passam a ser superficiais. Gotoh relata ainda que em alguns ácaros os embriões entram em diapausa após 54 horas da oviposição, tendo o desenvolvimento bloqueado no estágio de blástula.(Gotoh T., et. al,1994).

Assim que a blastoderme é formada, alguns núcleos permanecem no interior da massa de vitelo, e irão formar "células de vitelo". Antes da formação da blastoderme há poucas células de vitelo, depois de formada a blastoderme há uma

aumento rápido no número dessas células (Holm, 1952). Montgomery Jr. (1909) se refere às células de vitelo como vitelócitos, que se originam da invaginação de algumas células do disco germinativo em direção ao vitelo. Os vitelócitos também foram observados no desenvolvimento embrionário da aranha *Latrodectus mactans*, sendo derivados de células tanto de camada externa ou interna em embriões de estágios mais desenvolvidos (Rempel, 1957).

A primeira divisão da segmentação em *Epeira cinerea* está localizada no centro do ovo e, a medida em que ocorrem as divisões, o vitelo também vai se organizando em colunas que irradiam do centro para a periferia. Este arranjo é chamado pelo autor de “colunas de vitelo”. Os núcleos de clivagem migram pelas linhas de citoplasma entre as colunas de vitelo que se comunicam com o periplasma. Uma certa quantidade de citoplasma acompanha os núcleos durante esta migração para formar a blastoderme na superfície do ovo (Lambert, 1909).

Os vitelócitos não estão presentes apenas no desenvolvimento embrionário de aranhas, mas também em muitos insetos. Em *Ephemera japonica* eles aparecem assim que a blastoderme é formada (Tojo & Machida, 1998). No desenvolvimento do coleóptero *Lytta viridana*, os vitelócitos são encontrados abaixo da blastoderme no interior do vitelo (Rempel, 1965). No desenvolvimento de *Pedetontus unimaculatus*, o autor descreve dois tipos de vitelócitos: os vitelócitos primários que são formados logo quando se dá a formação da blastoderme e os vitelócitos secundários que ocorrem adjacentes à blastoderme (Machida et. al., 1990).

Em *Theridium tepidariorum* a primeira segmentação do ovo inicia-se 3 a 4 horas após a oviposição. Sucessivas divisões mitóticas ocorrem, até o estágio de 32 núcleos e há uma sincronia nas divisões. Os núcleos migram para a periferia do ovo,

e quando o número é de mais ou menos 140, forma-se a blastoderme. Todo o movimento dos núcleos do centro para a periferia do ovo é acompanhado simultaneamente com mudanças no interior do vitelo (Montgomery Jr., 1909). Durante o desenvolvimento embrionário de *Agelena labirintica* os primeiros núcleos de clivagem são visíveis 8 horas após a oviposição. Dezesesseis horas após podem ser observados oito núcleos entre o centro e a periferia do ovo. Durante o desenvolvimento o citoplasma cortical é funcionalmente dividido, os núcleos são rodeados por uma pequena quantidade de citoplasma finamente granulado localizado perto da periferia do ovo. Este citoplasma cortical é ligado a porções citoplasmáticas que se colocam por entre os grânulos e corpúsculos de vitelo. Com a formação da blastoderme, as células se individualizam. Esta fase ocorre 35 horas após a oviposição, apresenta células grandes e achatadas que envolvem toda a massa de vitelo (Holm, 1952). A clivagem não é apenas um aumento do número de células, mas também um processo migração de células. Em *L. mactans*, a clivagem começa 9 horas após a fertilização e nas quatro primeiras clivagens o padrão de divisão é regular e sincrônico. Da quinta divisão em diante esse padrão torna-se irregular, e após 25h os núcleos já migraram para a superfície do ovo e formam o blastema. Cinco horas depois de formada a blastoderme começam a se formar as paredes celulares. Simultaneamente com a clivagem ocorre uma reorganização do vitelo aparecendo colunas adjacentes que se fundem para formar uma estrutura em forma de pirâmide (Rempel, 1957).

Na aranha *Achaeranea japonica*, Theridiidae, grande número de grânulos rodeiam o citoplasma perinuclear e são organizados em arranjos radiais durante os estágios iniciais da clivagem. Este arranjo dos grânulos de vitelo pode ser causado

pela distribuição radial do citoplasma que contém feixes de microtúbulos que podem participar da migração e da clivagem dos núcleos para formar a blastoderme, e ocorre exatamente 16 h após oviposição. (Suzuki & Kondo, 1995).

Os ovos de *Linothele megatheloides* foram colocados em parafina líquida, para se poder observar seu desenvolvimento embrionário e foi possível notar 24 horas depois da oviposição a blastoderme com células poligonais, sendo a fase de gástrula atingida em 72 horas (Paz, 1993).

Na aranha *Ummidia fragaria* aproximadamente quatro dias após a oviposição os núcleos que sofreram clivagem chegam na periferia do ovo, formando uma única camada de células, a blastoderme. Neste momento o embrião se apresenta com aproximadamente 60-70 células, elas são grandes tendo o diâmetro aproximado de 200 a 250 μm , têm a forma poligonal e estão distribuídas igualmente sobre a superfície do ovo. À medida que as divisões celulares acontecem estas células tornam-se cada vez menores. Quando a blastoderme apresenta em média 200-300 células ocorre a contração da blástula. Neste momento um fluido claro é secretado para o interior da blástula, e então, forma-se a cavidade perivitelínica. Após oito dias da oviposição forma-se o disco germinativo (Yoshikura, 1972).

Após a formação da blástula, os grânulos de vitelo afundam para a parte inferior da blástula e aparece um espaço que é preenchido por um líquido chamado de líquido perivetelínico. Quando esse líquido é transferido para o exterior temos então o próximo estágio que é chamado de contração da blástula. (Foelix, 1982). A contração da blástula pode ser dividida em dois processos: primeiro a contração do vitelo seguida da contração da blastoderme (Suzuki e Kondo, 1995). Na aranha *Achaearanea japonica* a contração da blástula ocorre duas a três horas após a

formação da blastoderme quando é observado o aparecimento do espaço vitelínico e o desaparecimento da blastocele descrita como presente nesta espécie. O acúmulo de células acima da blastoderme no estágio da contração da blástula parece estar correlacionado com a formação das células do disco germinativo. Este se apresenta como uma camada de células esféricas no hemisfério superior do ovo (Suzuki e Kondo, 1995).

Em *Latrodectus mactans* as células da blastoderme que eram achatadas passam a ter a forma colunar na área que será futuramente a região central do disco germinativo. Esta aparência do disco germinativo se deve à contração da blastoderme que deixa parte do vitelo encoberta. Há um aumento de células abaixo do disco germinativo que absorvem o vitelo. Essas células são maiores do que as outras e são chamadas as primeiras células da endoderme. Seu aparecimento marca o início da gastrulação (Rempel, 1957).

Montgomery Jr. (1909) relata que depois de formado o disco germinativo algumas células tornam-se ligeiramente elevadas na superfície do ovo formando o cumulus anterior, rico em vitelócitos, células que ingerem rapidamente o vitelo que circunda uma pequena cavidade, a gastrocele. As células que serão o mesoblasto e mesentoblasto se espalham na superfície do ovo. O cumulus posterior surge como uma camada mais elevada e proeminente e vai marcar o limite entre os segmentos torácico e abdominal.

Segundo Foelix (1982) o lobo cefálico, lobo caudal e os somitos metaméricos os quais representam os respectivos segmentos dos pedipalpos e as patas estendem-se de uma região chamada banda germinal. O lobo cefálico emite um segmento adicional, o segmento caudal o qual se divide para formar o primeiro

segmento abdominal. Ao mesmo tempo tornam-se visíveis o segmento do prossoma e o desenvolvimento dos segmentos abdominais. No interior do corpo as cavidades celômicas tornam-se estabilizadas quando a mesoderme separa as paredes dessas cavidades posteriores que diferenciam-se em tecido muscular. A partir desse momento o embrião passa por um processo de inversão que é o aparecimento de um sulco longitudinal na metade da banda germinal. Este sulco aumenta gradualmente puxa lateralmente cada uma das partes do ovo, expondo a massa de vitelo abaixo do sulco mediano. Agora as extremidades abdominais vão se diferenciando e a metade dorsal do embrião está na direção oposta à banda germinal. Ou seja, o lobo cefálico numa extremidade e lobo caudal na outra, em direções opostas. A constrição do primeiro segmento abdominal indica o limite entre o prossoma e o opistossoma. Quando a forma típica do corpo das aranhas é estabelecida chega ao fim do processo de inversão. O próximo estágio é chamado de pré-larva.

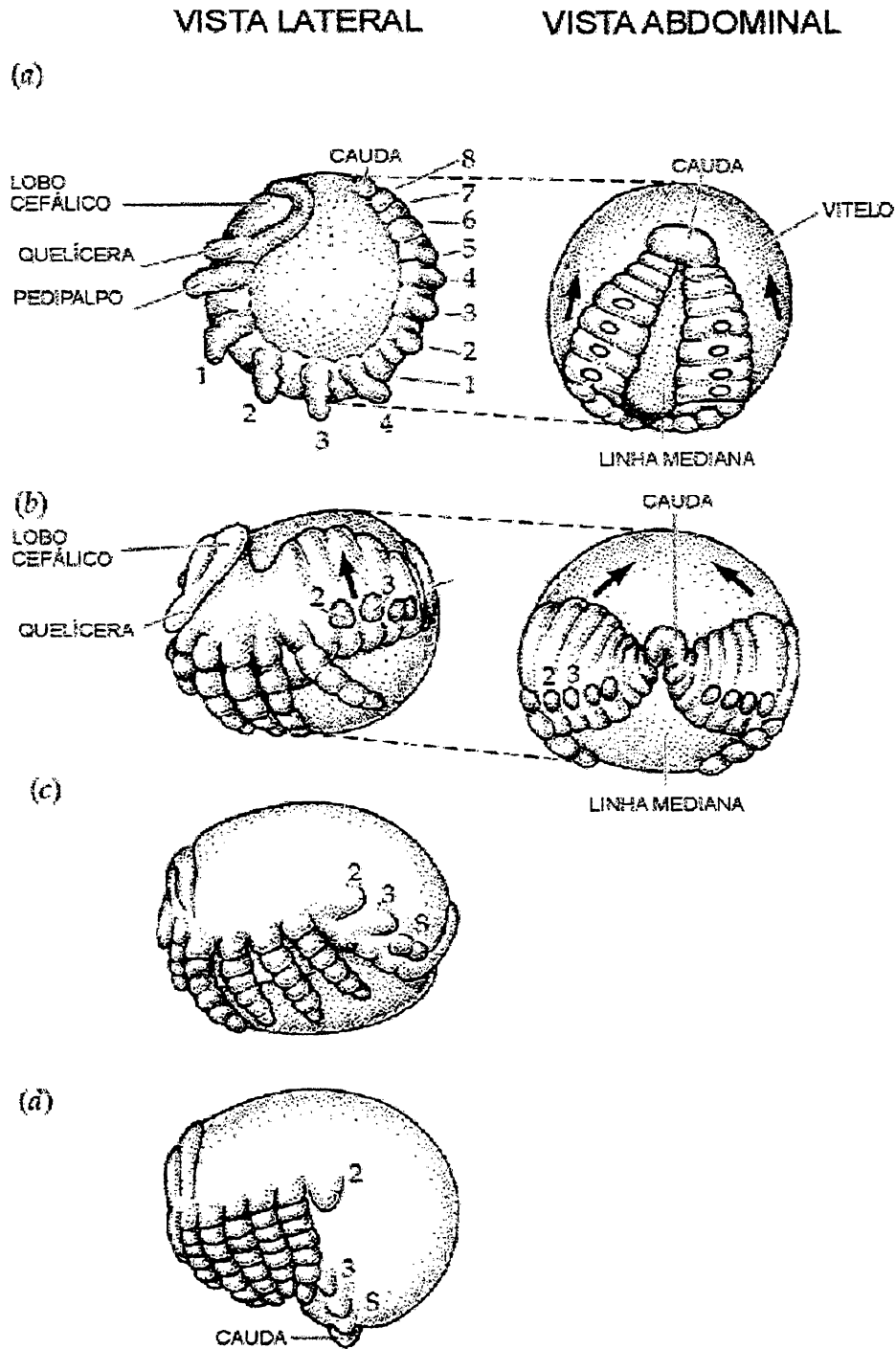


Ilustração 02 – Estágios tardios de desenvolvimento em aranhas.(a) começo da inversão. (b) Primórdios das extremidades externas aparecem nos segmentos abdominais 2-5. (c) Paredes laterais do corpo se fundem na linha média dorsal. (d) Término de inversão, embrião encobrendo a massa de vitelo. (FONTE: Gilbert e Raunio, 1997).

8) ASPECTOS RELEVANTES NO ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE GRUPOS DE INTERESSE.

Aos estudos baseados em microscopia sobre o desenvolvimento embriológico de aranhas e outros artrópodes deve-se ter a preocupação de aliar a análise de outros fatores que influenciam a reprodução como temperatura, umidade, disponibilidade de alimentos etc. Para se entender a biologia reprodutiva, ciclo biológico e as interações com o meio, ou seja, a ecologia de uma espécie é necessário o conhecimento de muitos dados e variáveis que só se obtém através da pesquisa.

Em ácaros *Argas reflexus* (Acari, Isopoda, Argasidae) o estudo da umidade relativa mostrou que níveis elevados afetam diretamente o desenvolvimento embrionário e a eclosão dos ovos, em condições laboratoriais (Buczek, 1991).

O desenvolvimento de *Achaeranea tepidariorum* pode sofrer influência do fotoperíodo juntamente com as condições de alimentação e umidade. Sob fotoperíodo longo (16L – 8E) o desenvolvimento dos machos e fêmeas foi acelerado, e sob fotoperíodo curto (10L – 14 E) o desenvolvimento foi mais lento (Miyashita, 1987).

Segundo a Secretaria Municipal de Saúde (1993) nos últimos 7 anos a incidência do gênero *Loxosceles* em Curitiba aumentou demasiadamente, principalmente da espécie *intermedia*, causadora do maior número de acidentes por aracnídeos na cidade. Vários fatores podem contribuir para o aumento populacional de aranhas dessa espécie, por exemplo, a baixa ocorrência de predadores naturais ou ainda o elevado poder adaptativo da espécie. A partir destes dados fez-se necessário à criação de uma comissão multidisciplinar para levantar informações

relevantes acerca desta espécie. Esta comissão inclui a subcomissão de ciência básica que, segundo a Secretaria Municipal de Saúde “tem como objetivo estudar a biologia da aranha, incluindo fatores ambientais que interfiram em seu ciclo biológico”, e que é a única subcomissão que não impõe objetivos a curto prazo, já que a pesquisa básica não funciona de maneira imediatista e, pois os resultados almejados podem ser obtidos a longo prazo.

Segundo Van Lenteren (1999), a pesquisa básica em reprodução deve ter prioridade, pois este tipo de pesquisa irá quase sempre resultar em aplicações, como já experimentado em manejo de pestes agrícolas. A pesquisa básica em reprodução é capaz de achar soluções inesperadas, como programas de manejo de pragas, com redução de aplicações de produtos químicos convencionais através da manutenção da diapausa, controle químico seletivo com reguladores do crescimento em insetos baseados em estudos endocrinológicos, e ainda programas de controle biológico econômicos baseados na diapausa e estudos sobre partenogênese. Ainda segundo Van Lenteren, quando a pesquisa é principalmente gerada por questões aplicadas, vê-se geralmente que a criatividade é bloqueada e as soluções encontradas são mais demoradas do que quando vistas por um ângulo puramente científico. A pesquisa fundamental em reprodução pode e irá ajudar a achar soluções sustentáveis para os problemas atuais.

Mesmo sendo de distribuição cosmopolita e tendo muita importância do ponto de vista epidemiológico e de saúde pública há poucos estudos sobre as aranhas que pertencem ao gênero *Loxosceles spp.* Quando se trata da espécie que mais ocorre em Curitiba a *Loxosceles intermedia*, os estudos ainda se tornam mais raros. Temos vários trabalhos que relatam a ação do seu veneno, e alguns dados sobre sua

biologia e ecologia. Não foram encontrados estudos tratando do desenvolvimento embrionário do gênero *Loxosceles spp.*

1.9 – OBJETIVOS

1.9.1 – Objetivo Geral

Contribuir com dados sobre o desenvolvimento da aranha *Loxosceles intermedia*, que possam apontar possível controle da reprodução da espécie.

1.9.2 – Objetivos Específicos

Descrever os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário da aranha marrom *Loxosceles intermedia*.

Empregar técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica e histoquímica no estudo de desenvolvimento embrionário da aranha *Loxosceles intermedia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Material Biológico

As aranhas utilizadas neste trabalho pertencem à espécie *Loxosceles intermedia*, gênero *Loxosceles*, família *Sicariidae*, sub-ordem *Araneomorphae*, ordem *Aranae*, classe *Arachnida*, filo *Arthropoda*.

2) Coleta e Acasalamento

Inicialmente as aranhas foram coletadas na região metropolitana de Curitiba no mês de novembro de 1999 até o mês de março de 2000. No laboratório foram separadas as aranhas jovens e as aranhas adultas, e estas foram mantidas em recipientes plásticos arredondados e transparentes de 15 cm de diâmetro, com capacidade de 500 ml. Em cada recipiente foi colocado um casal de aranhas adultas e para lhes servir de abrigo foi fornecida um pedaço de caixa de papelão usada para acondicionar ovos de galinha. A umidade foi mantida com bolinhas de algodão umedecidas três vezes por semana. A alimentação das aranhas inicialmente constituiu-se de larvas de *Tenebrio molitor*, mas como durante o período de coleta essas larvas ficaram escassas, passou-se a alimentar as aranhas com tatuzinhos de jardim *Porcelio sp* e formigas, três vezes por semana. Sobre o comportamento reprodutivo, a confecção da ooteca e oviposição, foram feitas observações diárias.

Inicialmente foram colocados vinte e dois casais para o acasalamento, e no decorrer do tempo, foram colocados outros casais, sendo que ao final do período de coleta trinta casais foram acasalados.

3) Obtenção dos embriões

Após observarmos que a ooteca foi construída e os ovos foram postos, estes foram retirados usando-se agulhas de vidro bem finas. A coleta dos ovos foi feita com muito cuidado, preservando ao máximo a forma da ooteca e sem deixar lacunas, para evitar a dessecação dos ovos. Inicialmente a cada coleta tentou-se manter uma certa quantidade de ovos dentro da ooteca, suficiente para se obter vários estágios de desenvolvimento de embriões. Parte dos ovos coletados foram colocados em parafina líquida para que se pudesse acompanhar o seu desenvolvimento. Analisando-se o comportamento reprodutivo da aranha *Loxosceles intermedia* verificou-se que a postura dos ovos se dá entre os meses de novembro a março coincidindo com a estação do verão, quando há o aumento da temperatura ambiental. Durante esse período foram realizadas coletas periódicas a fim de se obter os ovos em diversos estágios de desenvolvimento. Porém não foi possível coletar os estágios iniciais durante o período natural de postura que, em geral, ocorre à noite. As mudanças climáticas, com o declínio da temperatura ambiental no outono e inverno, dificultam as coletas, pois, conseqüentemente, o período de postura cessa. Para obter embriões ao longo do ano utilizou-se uma pequena estufa que foi mantida a temperatura média de 26° C a 28°C, na tentativa de reproduzir a temperatura na qual as fêmeas de *Loxosceles* costumam realizar sua postura. Dentro desta estufa foram colocados oito casais adultos dentro de recipientes plásticos de 250 ml de volume, nos quais havia um abrigo de papelão e bolinhas de algodão para manter a umidade. As condições de alimentação e umidade foram às mesmas já descritas acima. Os ovos coletados sob estas

condições foram fixados e parte foi colocado na parafina líquida para observação do desenvolvimento. Porém as observações sobre o seu comportamento continuaram sendo feitas durante todo o ano, não somente no período de postura.

4) Fixação

4. a) Os embriões coletados foram fixados em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 por 24 horas. Transcorrido o tempo de fixação os embriões foram lavados e mantidos em solução tampão fosfato 0.1 M, pH 7,4 até posterior processamento.

4. b) Parte dos embriões coletados foi submetido à fixação tanto química quanto física, pelo emprego de forno de microondas por meio de imersão dos ovos em 5 ml (placa de Petri de 3,5 mm de diâmetro) das soluções supracitadas e imediata radiação por 4 a 5 segundos em potência máxima. Em seguida, as amostras foram lavadas cinco vezes em solução tampão e mantidas nesta até o processamento.

5) Preparação para a microscopia de luz

5.a) Os embriões fixados e lavados em solução tampão foram desidratados em séries crescentes de etanol até 100% com intervalos de 15 minutos cada, diafanizados em xilol (2 trocas de 5 minutos cada), impregnados em Paraplast (Oxford Labwaer) fundida, em estufa a 58° C, e incluídos em moldes apropriados com posterior solidificação em geladeira. Parte dos embriões fixados e lavados em solução tampão foram desidratados em séries crescentes de etanol até 100% com

intervalos de 15 minutos cada e foram impregnados e incluídos em historesina (L.K.B.) a temperatura ambiente.

5.b) Obtenção dos Cortes e Coloração

Dos embriões emblocados em Paraplast (foram obtidos cortes em micrótomo, na espessura de $5\mu\text{m}$. Os cortes foram desparafinizados e hidratados para coloração com hematoxilina de Harris e eosina (H.E.) Após a coloração os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados com xilol e montados em resina Permout. Os cortes de embriões incluídos em historesina foram feitos na espessura de $3\mu\text{m}$, estendidos sobre a lâmina em gota de água e secados em placa aquecida e posteriormente corados com hematoxilina e eosina.

Alguns cortes foram tratados pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS) contrastados com hematoxilina, lavados em água corrente e montados em resina Permout. As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axiophot.

6) Preparação para a Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os embriões fixados foram lavados em solução tampão fosfato 0.1 M, por três vezes em intervalos de 15 minutos cada, pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% e tampão fosfato por uma hora, lavados em solução tampão fosfato 0.1M, desidratados em série crescente de etanol, tratados com óxido de propileno e emblocados em resina de Spurr.

Cortes semifinos (3 μm) e ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo LKB. Os cortes semifinos foram coletados em gota de água, secados em placa aquecida e corados com azul de toluidina 1% com borato de sódio 1%. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em tela de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1200 EXII).

7) Preparação para a Microscopia Eletrônica de Varredura

Os embriões fixados foram lavados em solução tampão 0.1M por 03 vezes com intervalos de 15 minutos cada, desidratados em série crescente de etanol até 100%. As peças foram colocadas em suporte apropriado e submetidas a ponto crítico e metalização e observadas em microscópio de varredura (PHILIPS SEM – 505).

8) Uso da Parafina Líquida (Óleo de Parafina Líquida)

A partir do mês de março de 2000, parte dos embriões coletados foram colocados na parafina líquida (Fischer) sendo os embriões submersos neste meio em lâminas escavadas ou placas de cultivo de 35 mm. Cuidado foi tomado para a colocação de poucos embriões por placa para que o desenvolvimento pudesse progredir. Usando esse método pode-se observar as mudanças ocorridas nos embriões diariamente. Essas mudanças foram fotografadas em fotomicroscópio (Zeiss) e os estágios analisados.

9) Uso da Faloidina para a visualização da actina celular

Os embriões coletados foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) fixados em paraformaldeído 4% em PBS por uma hora sob agitação constante. Após a fixação foram lavados em PBS e colocados em solução de PBS + Triton – X 1% durante 30 minutos sob agitação constante. Este procedimento foi repetido duas vezes.

Ao final desse procedimento os embriões foram incubados em solução de 1: 400 de TRITC – Phalloidin (Sigma)+ PBS +Triton – X 1% durante 40 minutos em câmara escura. Após esse tempo os embriões foram lavados com PBS, e montados em lâmina com Gelmount (Biomeda). As lâminas foram armazenadas no escuro, dentro de geladeira até o momento de visualização ao microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot.

10) Retirada dos envoltórios dos ovos

Para a retirada do córion os embriões foram lavados em hipoclorito de sódio 50%, três banhos de três minutos cada. A cada banho os embriões foram observados na lupa até ficarem descorionizados e então lavados com água destilada.

Para retirar a membrana vitelínica o embrião foi colocado numa solução de heptano acrescido do fixador, deixado no agitador por aproximadamente 20 minutos. Ao se notar que a membrana vitelínica já estava separada do embrião colocou-se metanol, deixando o material sob agitação constante. As membranas vitelínicas desprendidas ficaram na fase do heptano, juntamente com aqueles embriões que ainda tinham a membrana vitelínica. Aqueles sem membrana vitelínica foram para o fundo do frasco. Nessa fase aproximadamente 80% dos embriões perderam a

membrana vitelínica. Imediatamente retirou-se respectivamente o heptano, o fixador e o metanol. A seguir os embriões foram lavados no mínimo três vezes no metanol e nele mantidos no freezer até o processamento.

RESULTADOS

1) OBSERVAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ACASALAMENTO

Durante o acasalamento o macho fica embaixo da fêmea apoiado em suas patas traseiras e introduz o gonopódio até o receptáculo seminal da fêmea enquanto esta movimenta o seu abdome para cima e para baixo. O macho coloca os dois gonopódios dentro dos orifícios do receptáculo seminal, mas antes que isso ocorra ele faz muitos movimentos com seus gonopódios. Assim que o macho retira seus gonopódios a fêmea faz movimentos para cima e para baixo com seu abdome, esses movimentos são rápidos e curtos. Após o acasalamento o macho e fêmea ficam perto um do outro, imóveis. Todo ritual de acasalamento dura cerca de 20 minutos aproximadamente. Após esse tempo a fêmea se distancia do macho ficando do outro lado do abrigo.

2) CARACTERÍSTICAS DA OOTECA

A ooteca de *Loxosceles intermedia* em geral é pequena, possui forma discóide e coloração esbranquiçada, apresentando um diâmetro aproximado de 1 cm. O número de ovos por ooteca em nossas observações variou bastante, sendo em média de 41,9 ovos por ooteca (Tabela 01).

OOTECA	Nº DE OVOS	OOTECA	Nº DE OVOS
1-	29	16-	42
2-	40	17-	49
3-	55	18-	52
4-	42	19-	40
5-	48	20-	39
6-	61	21-	45
7-	52	22-	41
8-	40	23-	18
9-	60	24-	60
10-	59	25-	28
11-	28	26-	20
12-	50	27-	38
13-	48	28-	25
14-	41	29-	29
15-	40	30-	40

Tabela. 01 – Relação do número de ovos por ooteca examinada.

Cada ovo tem diâmetro aproximado de 01 mm. Quanto ao número de posturas no laboratório constatou-se que algumas fêmeas realizaram apenas uma postura, outras realizaram mais de uma, sendo que duas fêmeas realizaram quatro posturas e uma fêmea chegou a ter cinco posturas no período de observação que foi do mês de novembro de 1999 até março de 2000. A maioria das fêmeas, no entanto,

realizaram de uma a duas posturas no período de estudo. A fêmea permanece perto da ooteca durante todo o tempo de incubação (FIGURA 01). Outro fato que merece atenção é de que algumas aranhas fêmeas coletadas, não foram colocadas junto ao macho no laboratório e mesmo assim realizaram sua postura que resultou em ovos embrionados. Provavelmente elas já tinham sido fecundadas antes do momento da coleta.

3) OVIPOSIÇÃO E COLETA

Após o acasalamento decorreram em média 45 dias para que ocorra a postura. A fêmea inicia a confecção da ooteca pelo assoalho formado por fios de seda finos e apoiados no substrato, dentro do abrigo, longe da luz. Após a confecção da parte inferior da ooteca a fêmea se posiciona mais ou menos verticalmente e ali inicia a oviposição. Terminada a postura a fêmea dá início à construção da parte superior da ooteca. De acordo com nossas observações as fêmeas realizam a postura geralmente à noite. Desde o momento do início da confecção do assoalho da ooteca até o momento da oviposição decorreram em média três horas, e o tempo requerido para oviposição foi de aproximadamente 40 minutos.

No momento da oviposição os ovos estão envoltos em um líquido viscoso e transparente, ficando muito aderidos uns aos outros devido à presença desse líquido, o que torna difícil manuseá-los. A presença desse líquido viscoso quando do exame de uma ooteca é um indicativo de que a postura ocorreu há pouco tempo. Os ovos totalmente individualizados dentro da ooteca indicam que a postura ocorreu aproximadamente 15 a 20 horas.

O líquido viscoso que envolve os ovos vai evaporando da periferia para o centro: foi comum encontrar ovos dentro da ooteca estando os mais periféricos já totalmente individualizados enquanto os que estavam localizados no centro ainda estavam muito aderidos uns aos outros. Os embriões mais desenvolvidos foram retirados de dentro da ooteca sem maiores dificuldades, pois já estavam totalmente individualizados. Num primeiro momento a intenção era de se fazer retiradas dos ovos de uma mesma ooteca em diferentes intervalos de tempo. Porém esse procedimento não foi possível, porque, mesmo tomando muito cuidado para manter a forma da ooteca após o manuseio, a fêmea teve um comportamento agressivo e comeu o restante dos ovos. Foi possível observar o cuidado constante do casulo pela fêmea e notar que qualquer perturbação interfere negativamente em seu comportamento.

4) DESENVOLVIMENTO NA PARAFINA LÍQUIDA

Nos estágios iniciais foi possível observar os grânulos de vitelo distribuídos de maneira homogênea por todo o ovo (FIGURAS 2,3). Com a progressão da clivagem o vitelo passou a sofrer rearranjo, pois observou-se regiões translúcidas que, por sua aparência, sugerem a presença de lipídeo enquanto outras áreas são opacas. Estas áreas parecem corresponder às regiões do citoplasma onde se encontram os núcleos em divisão (FIGURA. 3). No mesmo conjunto de embriões foi possível observar alguns em que a clivagem já estava bem adiantada, com claras delimitações de áreas citoplasmáticas contendo o núcleo centralmente (FIGURA. 4). Os embriões foram observados a intervalos de 24 h sendo possível analisar a progressão do desenvolvimento com a movimentação, dos núcleos para a superfície

e organização da blastoderme com delimitação das células que passam a envolver o vitelo.

No início estas células são grandes, mas a seguir sofrem mudança de forma, o que causa contração da blástula e conseqüente aparecimento do espaço perivitelínico (FIGURA. 5). No processo da contração da blástula as células vão se dirigindo para um dos pólos do embrião e o espaço perivitelínico fica mais evidente. (FIGURA 6). Ao final da contração da blástula as células ficam agrupadas num determinado pólo do embrião enquanto o vitelo se distribui por todo o restante. A partir deste estágio o embrião passa a formar o disco germinativo que repousa sobre o vitelo (FIGURA. 7).

Observou-se a seqüência do desenvolvimento dos embriões até o estágio de pré-larva, em que os embriões ainda estão envoltos pelo córion, não possuem mobilidade e a segmentação das patas é incompleta (FIGURA 8). Foi ainda possível observar o desenvolvimento até a eclosão, em que o córion se rompe e as pré-larvas começam a movimentar-se. Nesse meio foi possível observar que ovos pertencentes a uma mesma postura se apresentavam em diferentes estágios de desenvolvimento.

O meio parafina líquida não interferiu no metabolismo do desenvolvimento embrionário, pois as pré-larvas que eclodiram (FIGURA 09) apresentavam aspecto normal e movimentavam-se ativamente. Mas as larvas, se deixadas nesse meio, não continuavam seu desenvolvimento, vindo a morrer.

5) DESENVOLVIMENTO INICIAL

Dados obtidos em nosso laboratório (Morishita, comunicação pessoal) mostram que os ovócitos maduros são liberados caindo na luz do oviduto, envoltos

pelo envoltório vitelínico. No trajeto para abertura genital recebem as camadas adicionais que vão constituir o córion.

Ovos coletados no momento da oviposição apresentaram o córion composto de grânulos esféricos presos a uma banda contínua ao redor do ovo. Os grânulos mostraram reação negativa ao PAS o que sugere que possam conter carboidratos sulfatados (FIGURA 10). Ao microscópio de varredura observa-se que os grânulos são de tamanhos variados estando os menores aderidos à superfície plana que acompanha a do ovo enquanto os maiores formam grumos mais salientes.(FIGURA 11) Foi ainda possível observar, em regiões em que se provocou descontinuidade do córion, o envoltório vitelínico subjacente (FIGURA 12).

O envoltório vitelínico situado logo abaixo do córion apresenta-se à microscopia de luz, como linha muito fina nestes ovos. Logo abaixo do envoltório vitelínico está o citoplasma cortical ou periplasma que forma uma camada contínua da qual partem porções de citoplasma que percorrem, em direção ao centro, espaços entre os grânulos de vitelo. Parece existir certa polarização no ovo pois observa-se distribuição desigual de grânulos no citoplasma cortical: em cortes corados com azul toluidina pequenas estruturas metacromáticas aparecem distribuídas pelo citoplasma em um dos lados do ovo (FIGURA13). Já os grânulos de glicogênio evidenciados pelo PAS distribuem-se uniformemente por todo o citoplasma apical (FIGURA 10). Mesmo tendo sido feito cortes seriados não foi possível evidenciar o núcleo do ovócito ou o do espermatozóide em ovos deste estágio.

Ovos examinados algumas horas após a oviposição apresentaram grânulos de vitelo com graus diferentes de eosinofilia, homoganeamente distribuídos por todo

o ovo, ficando o citoplasma restrito à periferia e a delgadas porções localizadas entre os grânulos de vitelo (FIGURA 14). Num dos lados do ovo é possível observar porção de citoplasma que se aprofunda, enquanto o vitelo preenche a região apical (FIGURA 15). Cortes seriados, corados com H.E., permitiram a localização de somente dois núcleos reconhecidos pela sua basofilia. Um destes núcleos estava localizado próximo à periferia do ovo claramente relacionado com raio de citoplasma conectado ao periplasma (FIGURA 16). O outro núcleo encontrava-se em porção de citoplasma localizada centralmente e completamente envolta por grânulos de vitelo (FIGURA 17). Nestes ovos o envoltório vitelínico é bem evidente, como faixa larga, justaposta ao periplasma e fortemente corado pela eosina (FIGURA 16).

O vitelo parece sofrer rearranjo à medida que o desenvolvimento progride, pois tanto em embriões vivos observados ao estereomicroscópio (FIGURA 18), como em cortes em H.E., é possível observar arranjo radial dos grânulos de vitelo, que provavelmente é consequência de organização de raios de citoplasma que se dirigem para a periferia do ovo (FIGURA 19) e que se tornam mais evidentes.

Esses raios de citoplasma são usados pelos núcleos em mitose que rodeados por citoplasma constituem as energides e dirigem-se gradualmente para a periferia do ovo (FIGURA 20). É interessante notar que os núcleos continuam a dividir-se à medida que percorrem o trajeto migratório, e mesmo quando já imersos no periplasma (FIGURAS 21 e 22). Uma vez nessa localização os núcleos passam a ser completamente rodeados por citoplasma, tornando-se centrais e as células se individualizam constituindo a blastoderme (FIGURA 23).

As células de blastoderme são células achatadas com núcleos grandes. Os limites celulares tornam-se nítidos sendo o periplasma incorporado pelas células

(FIGURA 23). O citoplasma que antes apresentava-se muito vacuolado passa a um arranjo mais compactado apresentando finas granulações (FIGURAS 24 e 25). Em material tratado com faloidina foi possível identificar os microfilamentos de actina que dispõem-se em feixes em várias direções no interior da célula e ancoram na face citoplasmática da membrana (FIGURA 25).

Algumas células não chegam na periferia do ovo permanecendo no citoplasma central que é envolto pelos grânulos de vitelo e constituem os chamados vitelócitos. Estas células são grandes com núcleos claros com nucléolo evidente, que são sinais de metabolismo ativo. Não foi possível observar a organização da membrana plasmática destas células em relação ao vitelo circunjacente (FIGURAS 27 e 28).

O córion neste estágio permanece com o mesmo aspecto descrito anteriormente, porém o envoltório vitelínico que se apresentava como uma linha muito fina abaixo do córion no momento da oviposição torna-se, a partir do início da clivagem, bem evidente e pode ser observado como uma camada mais ampla que se cora fracamente pela eosina e é negativa ao PAS (FIGURA 25).

O aspecto ultraestrutural do envoltório vitelínico revela linha fina mais eletrodensa que fica voltada para o córion e uma camada larga com minúsculos grânulos eletrodensos que fica em contato direto com a superfície do embrião (FIGURA 29).

As células continuam se multiplicando e simultaneamente vão diminuindo de tamanho no processo chamado contração da blástula, e passam a localizar-se num dos pólos do ovo enquanto que o vitelo passa a ocupar o restante do ovo (FIGURA 30). Quando as células da blastoderme já passaram pelo processo de contração da

blástula e estão localizadas todas num pólo do ovo, passam a organizar-se num conjunto chamado disco germinativo em que ocorrem os processos de formação dos folhetos germinativos e posterior organogênese. Este disco apóia-se sobre o vitelo que agora passa a ser extraembrionário (FIGURAS 7, 31 e 32). As células do disco germinativo continuam a sofrer mitoses e vão adquirindo características próprias tornando-se progressivamente diferentes umas das outras (FIGURA 33). Não está no escopo desse trabalho a descrição das etapas que se seguem à formação do disco.

É interessante notar que à medida que o desenvolvimento progride o vitelo sofre drásticos rearranjos. Como já descrito, (FIGURA 19) no início da clivagem os grânulos se dispõem em arranjo radial e apresentam aspecto relativamente uniforme. Em estágios de desenvolvimento mais avançados a distribuição dos grânulos fica menos ordenada (FIGURAS 20 e 23), mas ainda é possível observar entre eles grandes espaços, talvez representando a imagem negativa de lipídeo, uma vez que este material foi tratado com xilol para a inclusão em parafina. Quando começam a se formar as camadas celulares o vitelo apresenta grandes grânulos corados fortemente pela eosina, mas também apresenta grânulos grandes, com vários espaços pequenos e arredondados que provavelmente são gotículas de lipídeo rodeadas por proteínas básicas, pois estes grânulos apresentam eosinofilia intensa que parece demarcar seus limites no citoplasma (FIGURA 30).

Quando as células se organizam em disco germinativo o vitelo passa por rearranjos mais drástico: a porção relacionada com as células do disco tem grandes grânulos muito eosinófilos, cada um com muitas gotículas lipídicas, entre os quais há muitos espaços vazios evidenciando a presença de lipídeo. Adjacente a esta

camada há faixa contínua eosinófila que não possui lipídios e que parece delimitar o disco germinativo do restante do vitelo. Devido à forma compactada das células durante o estágio de disco germinativo em um dos pólos, o vitelo parece ficar exteriorizado em relação às células, formando uma grande camada contínua que ocupa todo o restante do ovo. O vitelo desta região perde o aspecto granular descrito acima, e torna-se uma massa contínua em que é possível visualizar muitas gotas de lipídio (FIGURA 31). Parece haver um fluxo do vitelo, em que os grânulos se desfazem enquanto as células se movimentam para a região do disco. Quando este já está estabelecido os grânulos se reorganizam alguns reassumindo o aspecto homogêneo enquanto outros ficam vacuolados (FIGURAS 32 e 33).

Portanto, ao se estudar o desenvolvimento de aranhas, temos que levar em consideração não só as mudanças celulares ocorridas, mas também o comportamento do vitelo porque este muda em cada estágio do desenvolvimento. Deve-se levar em conta também a metodologia empregada, pois o tipo de inclusão utilizado mostrou ser um fator que pode revelar diferentes aspectos de um mesmo material. O tratamento para inclusão em historesina em que se utiliza somente etanol, não provoca a retirada drástica dos lipídeos, como ocorre quando se utiliza o xilol previamente à inclusão em Paraplast. Sendo assim o aspecto do vitelo em cortes de historesina é mais homogêneo e parece haver melhor preservação dos raios citoplasmáticos (Comparar Figuras 20 e 22).

FIGURAS

Figura 01 – Macho adulto (m) com os pedipalpos (▶), fêmea (f) um pouco menor que o macho perto da ooteca (→).



Figura 2 – 5

2 – embrião com distribuição homogênea de grânulos de vitelo (v), aumento 400x.

3 – regiões dos núcleos em clivagem (n), vitelo (v), aumento 400x.

4 – células da blastoderme (c) recobrem toda a superfície da blástula, detalhe núcleo central da célula da blastoderme (→) aumento 500x.

5 – embriões com início da formação de espaço perivitelínico (→), c = córion, detalhe blástula em contração (→) aumento 400x.

Notar embriões em vários estágios de desenvolvimento em uma mesma amostra (figuras 2 e 3).

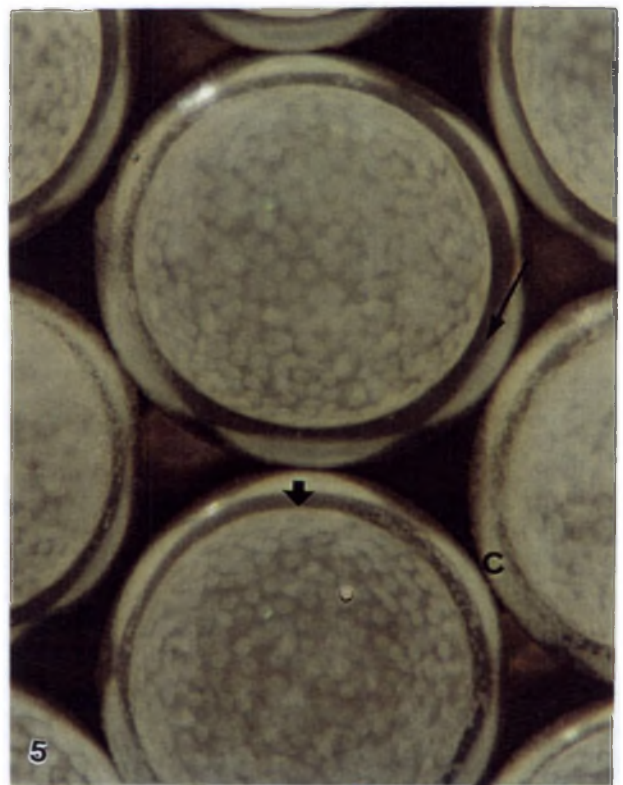
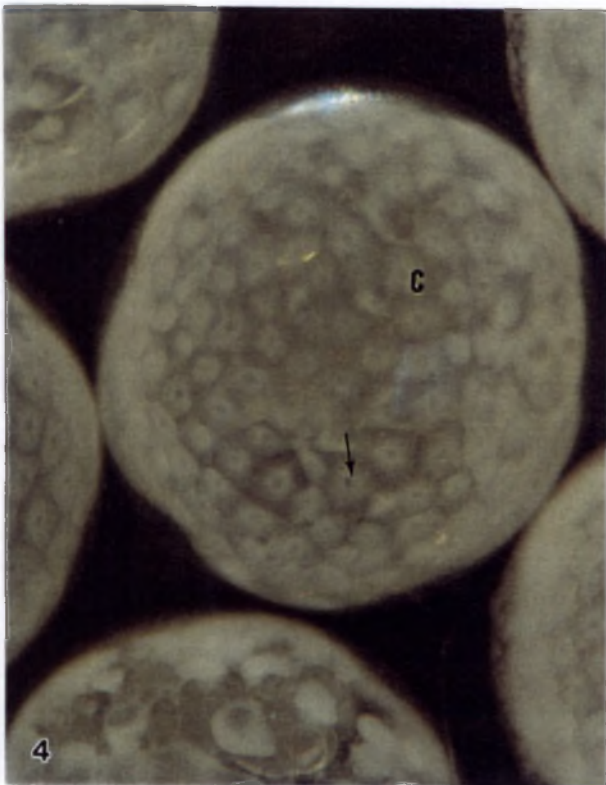
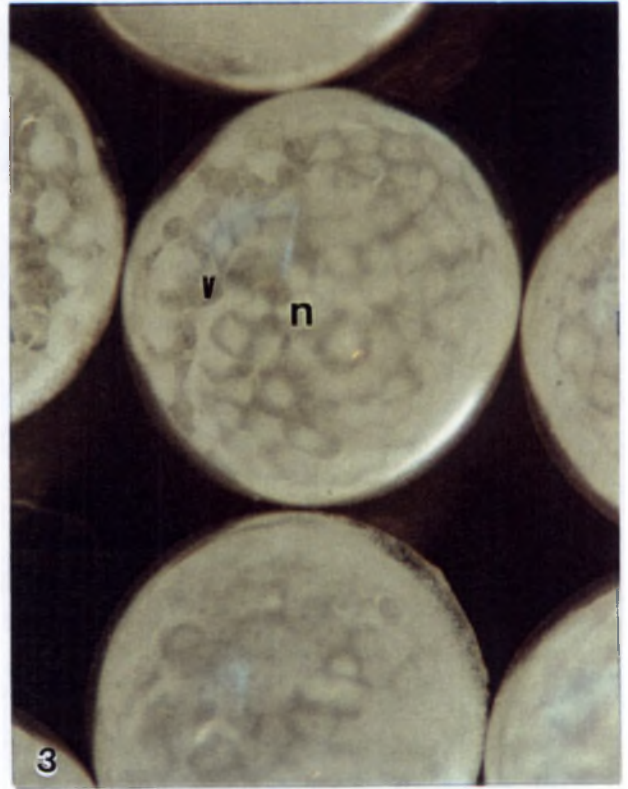
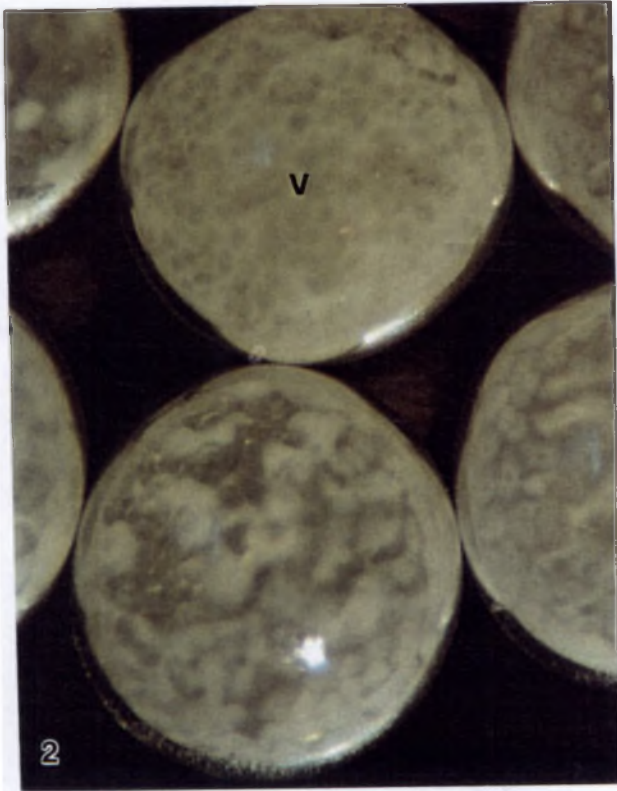


Figura 6 - Embriões na parafina líquida, alguns estão ainda no estágio da blástula (➔); detalhe de outro embrião no estágio da contração da blástula e o espaço perivitelínico (→), aumento 320x

Figura 7 – Embriões no estágio de disco germinativo: as células ficam agrupadas em um dos pólos do embrião (→) enquanto o vitelo ocupa o restante(▶), aumento 400x

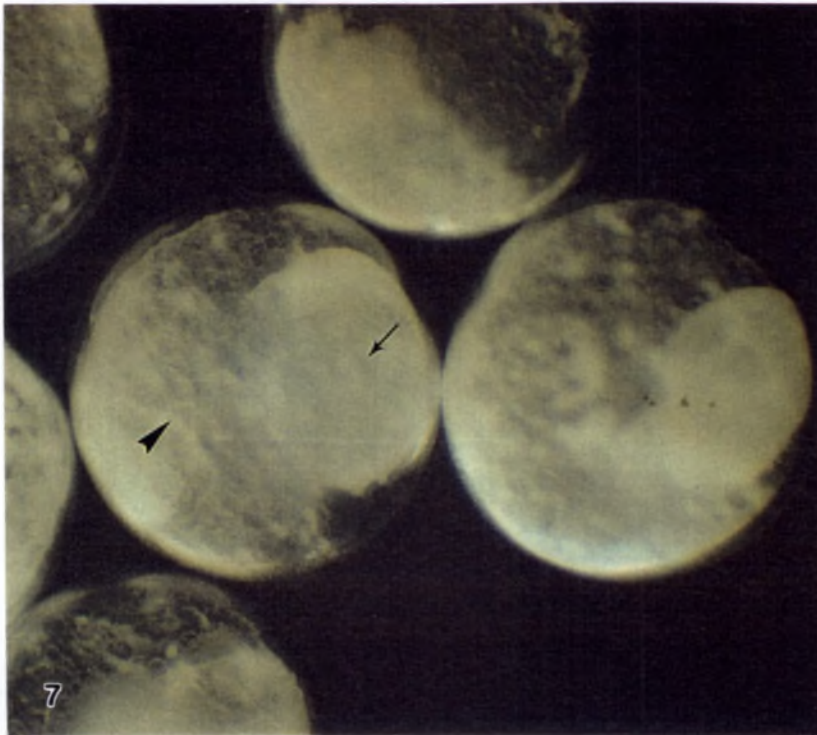
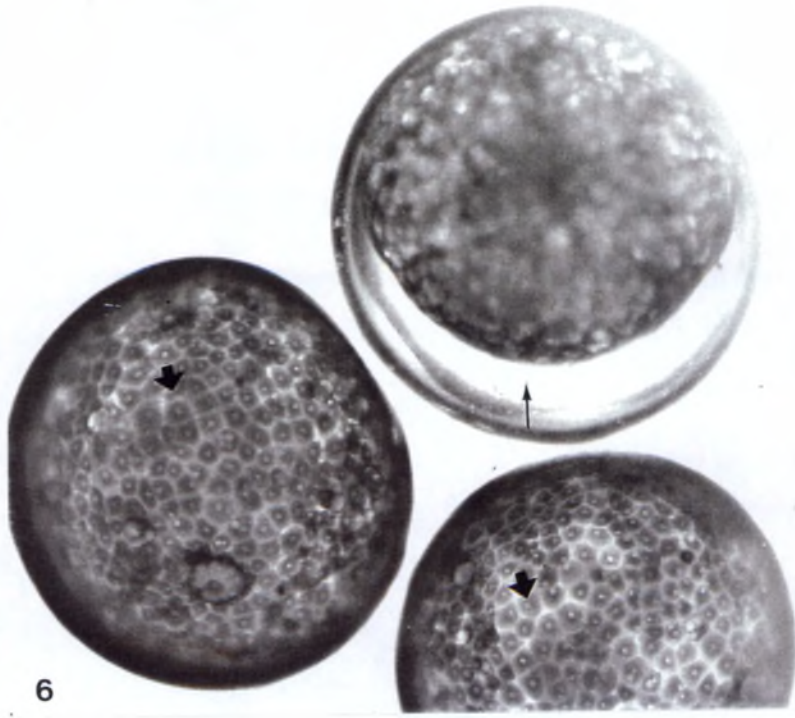


Figura 8 – Embriões na parafina líquida no estágio de pré-larva (→), detalhe da segmentação incompleta das patas (►), aumento 500x.

Figura 9 – Embriões na parafina líquida no estágio de pré-larva no momento da eclosão (→), detalhe do córion que nesse momento é rompido (*).

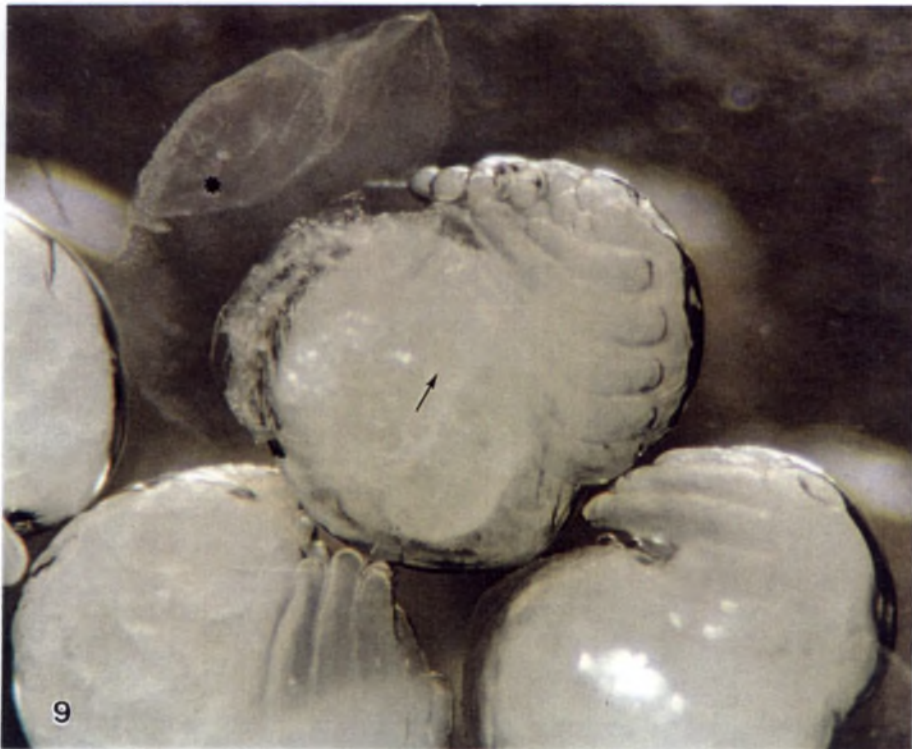
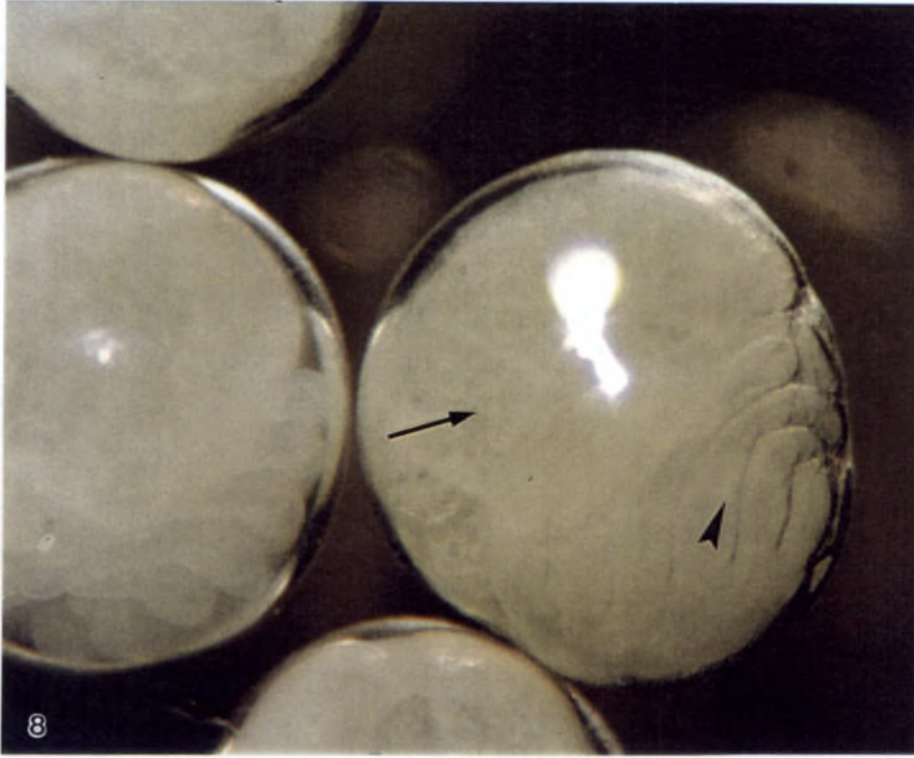


Figura 10 – Corte de embrião tratado com PAS: Córion com diversos grânulos arredondados com reação PAS negativa (▶), grânulos de vitelo (v) com graus variados de positividade ao PAS; distribuição de grânulos de glicogênio no citoplasma apical (→), aumento 400x.

Figura 13 – Corte de embrião incluído em resina Spurr corado com azul de toluidina. Observar distribuição de grânulos metacromáticos no citoplasma cortical (→), aumento 1000x.

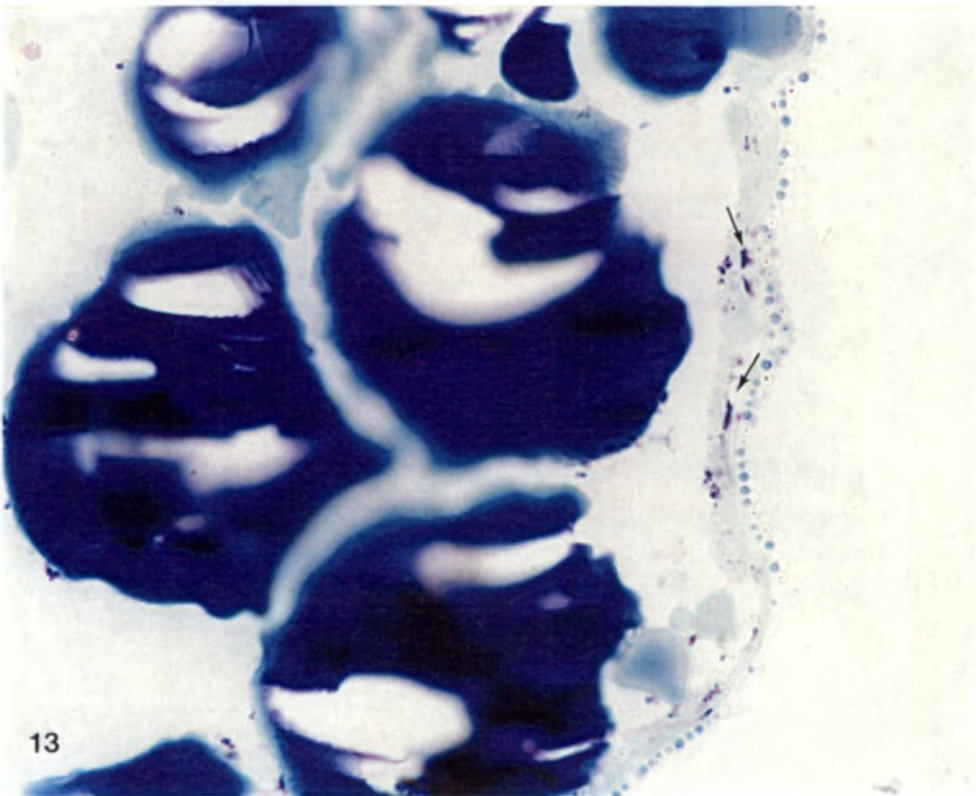
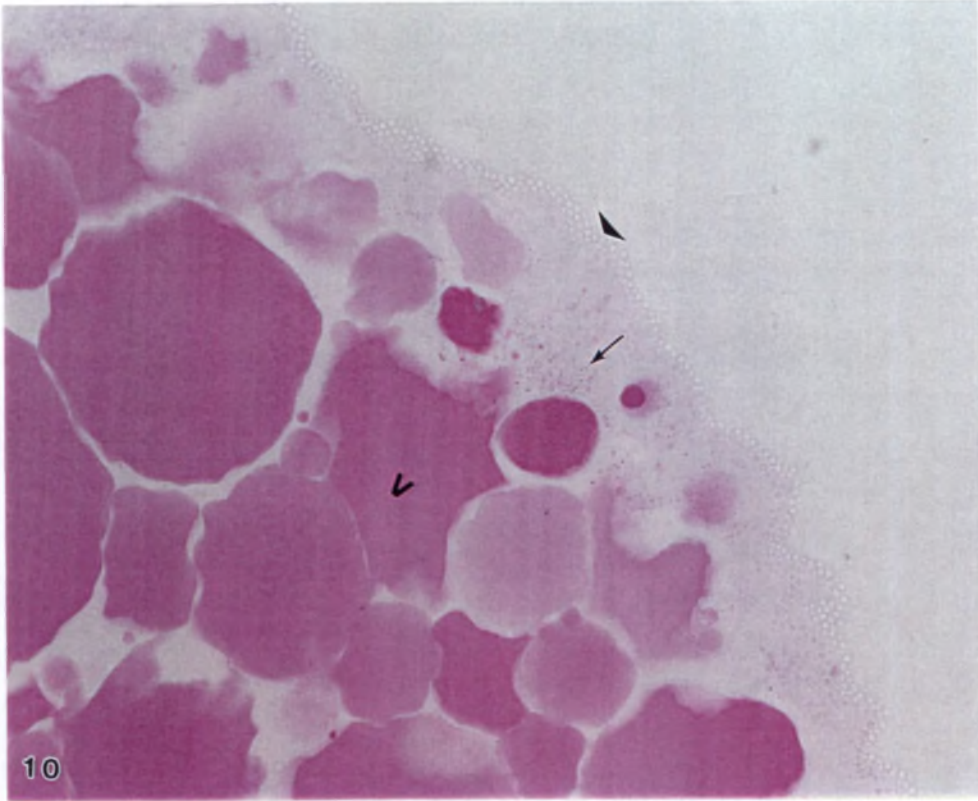


Figura 11 - Imagem do córion ao microscópio de varredura. Notar grânulos pequenos (▶) assentados sobre camada contínua (→) e grânulos maiores mais superficiais (➔), aumento 2991x

Figura 12 – Imagem ao microscópio eletrônico de varredura de embrião que teve o córion parcialmente rompido. Observar o envoltório vitelínico subjacente (ev), aumento 1000x.

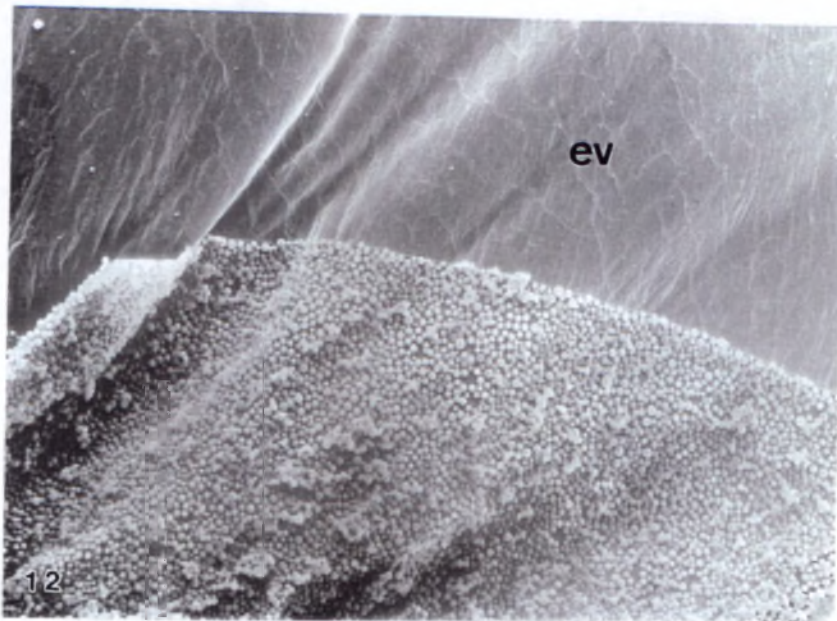
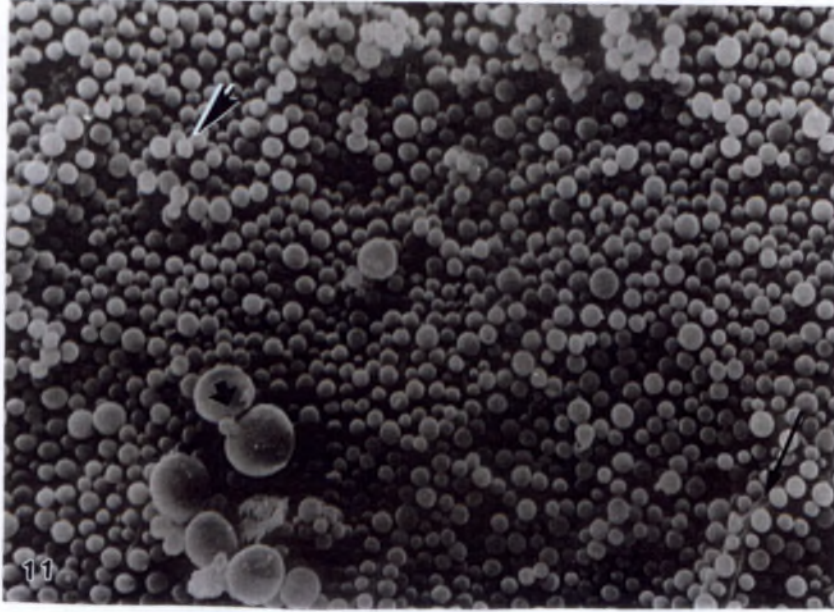


Figura 14 - Corte de embrião corado com H.E. Observar grânulos de vitelo (v) homogeneamente distribuído por todo o ovo, apresentando áreas com diferentes graus de eosinofilia. Citoplasma apical na periferia do ovo (→), aumento 100x.

Figura 15 – Corte de embrião corado com H.E. evidenciando área de citoplasma que aprofunda (*) enquanto o vitelo distribui-se na superfície (→). Esta distribuição foi observada somente em um dos lados do ovo. Embriões incluídos em historesina, aumento 400x.

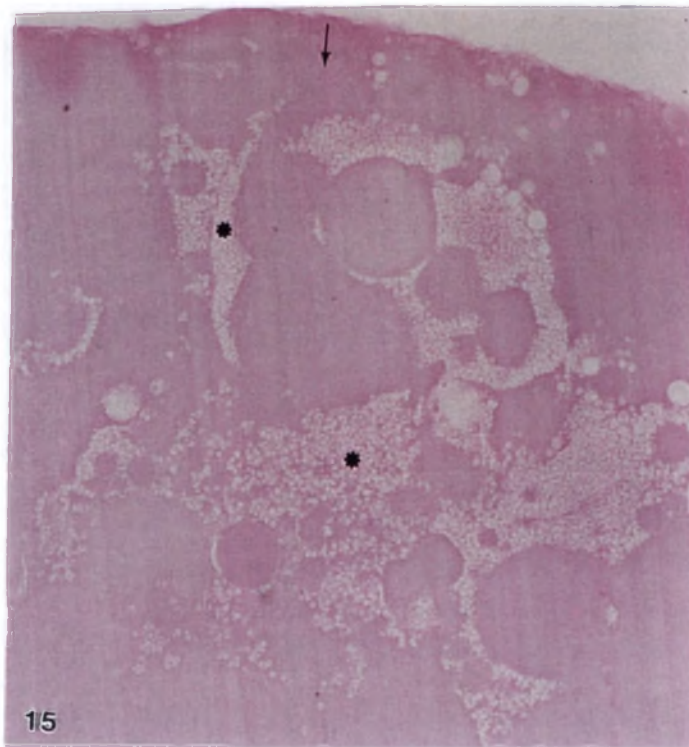
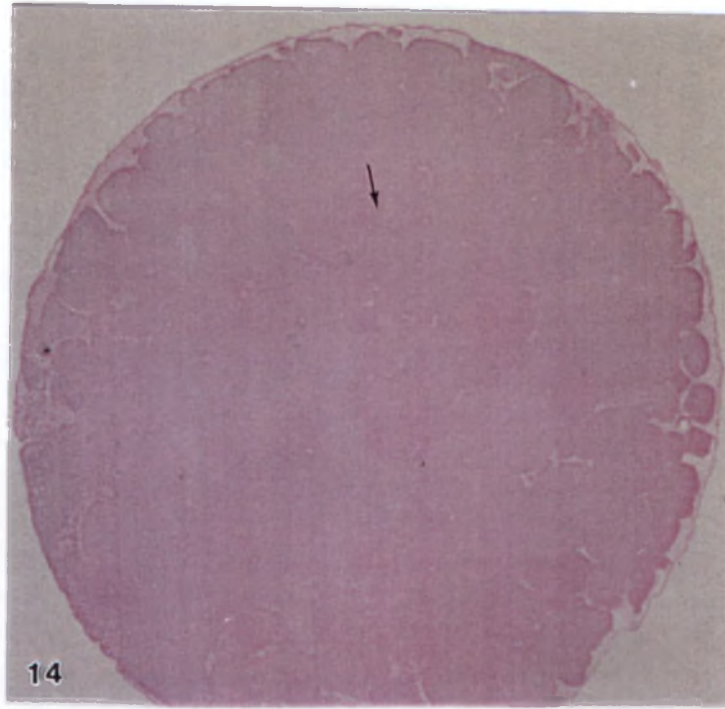


Figura 16 – Corte seriado corado em H.E. de ovo em estágio inicial de desenvolvimento, com um núcleo localizado perto da periferia do ovo (→). O envoltório vitelínico se mostra como faixa fortemente corada pela eosina (▶), aumento 400x.

Figura 17 - Corte seriado de ovo em estágio inicial de desenvolvimento corado com H.E., evidenciando um núcleo (→) no citoplasma localizado centralmente, rodeado pelo vitelo (*). Embriões incluídos em historesina, aumento 400x.

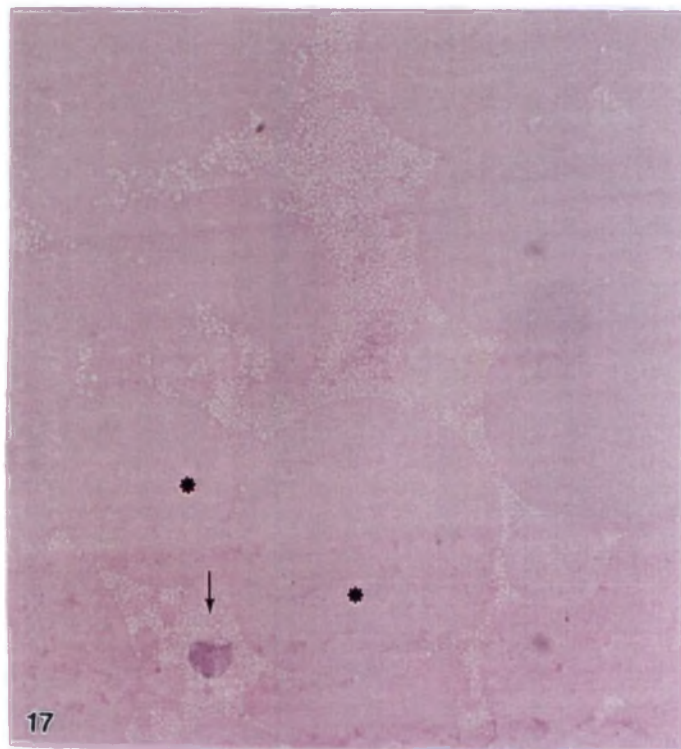
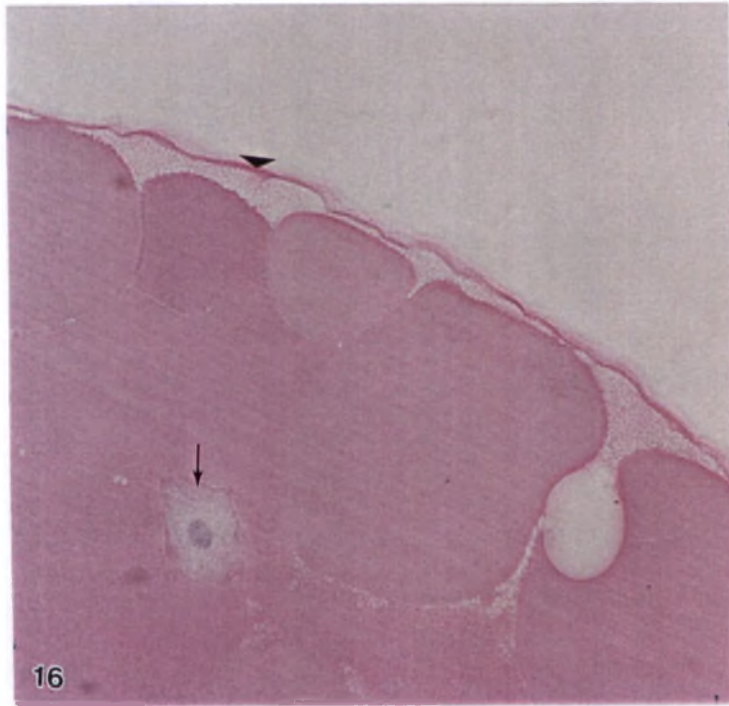
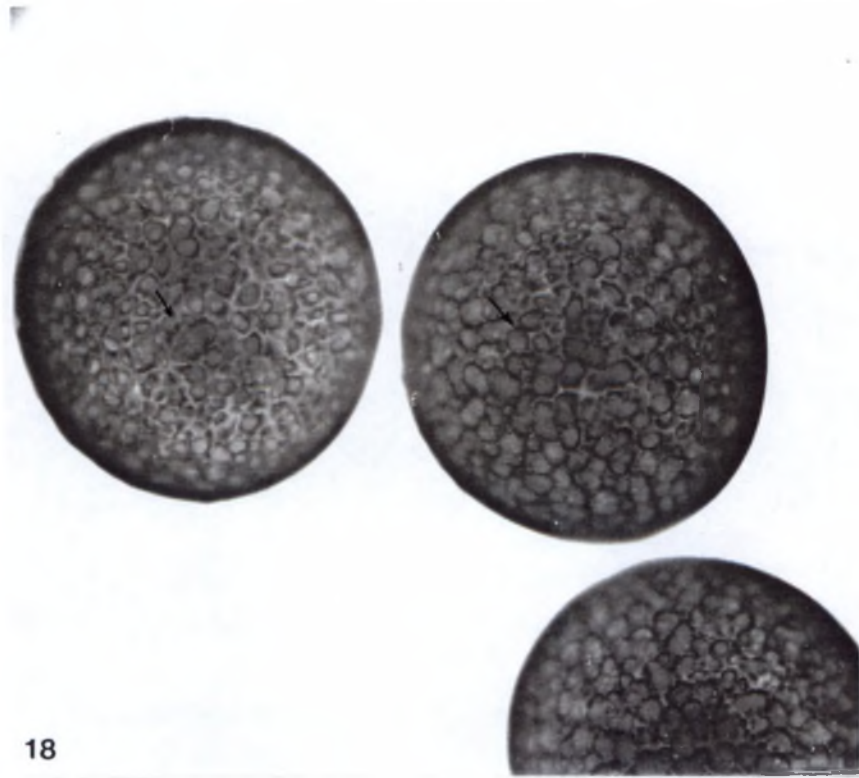
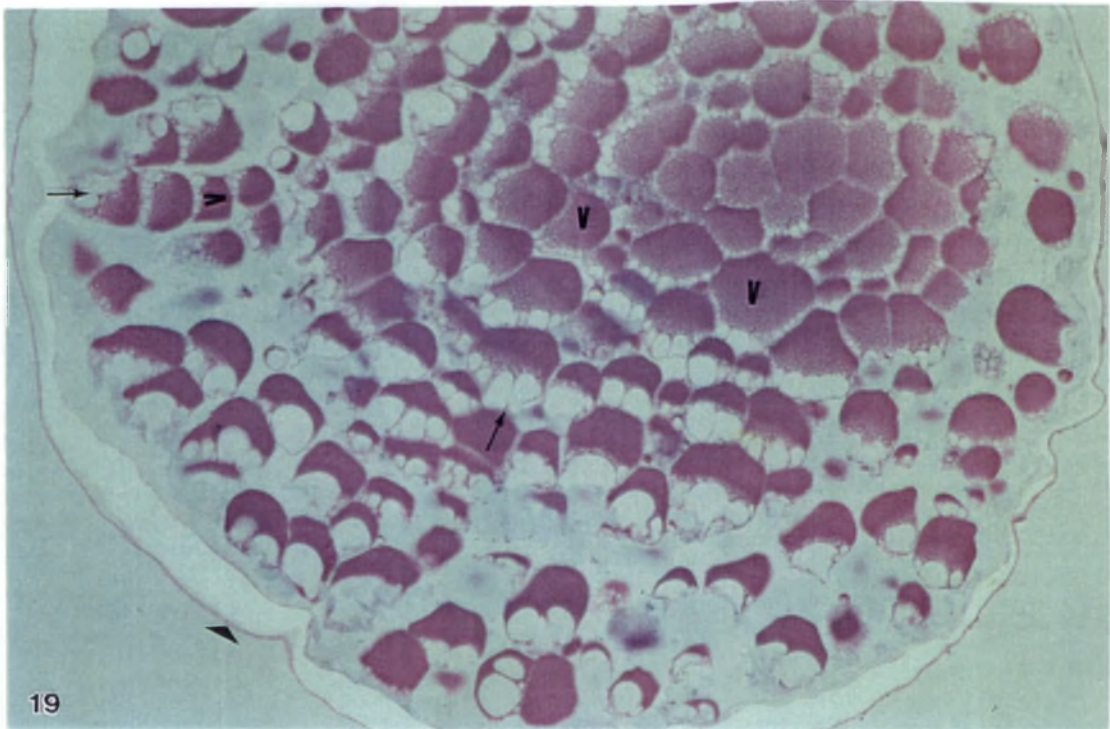


Figura 18 – Ovos em parafina líquida, mostrando o arranjo radial do vitelo (→), aumento 320x.

Figura 19 – Corte corado em H.E. mostrando o arranjo radial do vitelo (→) detalhe do córion (▶), grânulos de vitelo (v), aumento 200x.



18



19

Figura 20 - Corte corado em H.E., mostrando os raios citoplasmáticos (*) que são usados para a migração dos núcleos (→), vitelo (v), neste corte o córion foi retirado, aumento 200x.

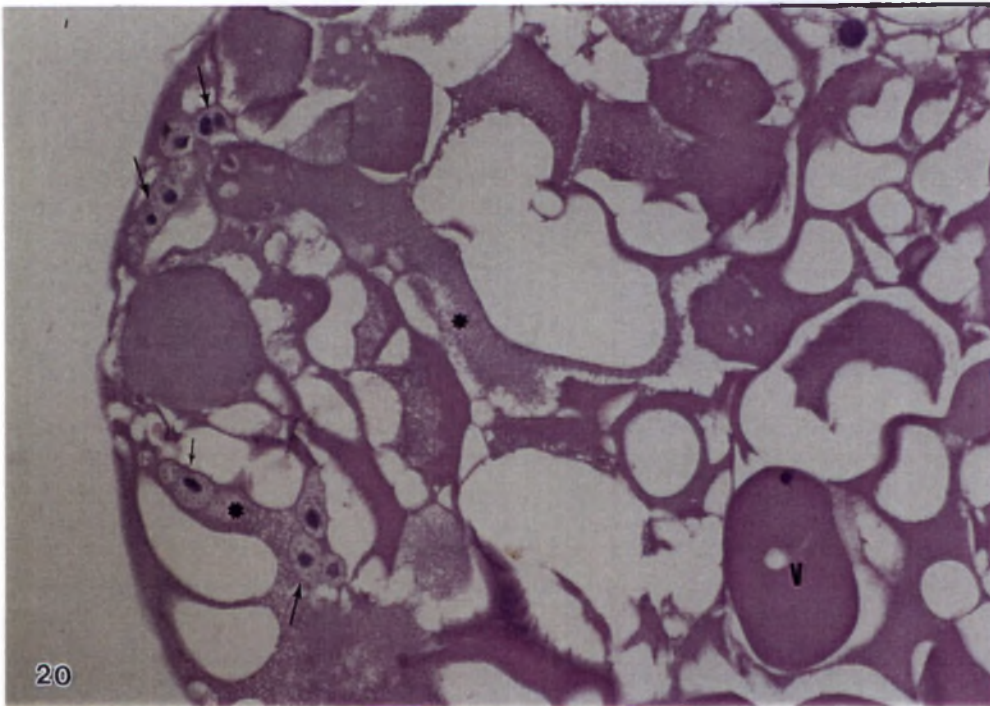


Figura 21 – Corte corado em H.E. mostrando núcleos em divisão na periferia do ovo (→), (ev) envoltório vitelínico, aumento 400x.

Figura 22 – Corte corado em H.E., núcleos em divisão no periplasma (→), (v) vitelo, (ev) envoltório vitelínico, aumento 400x.

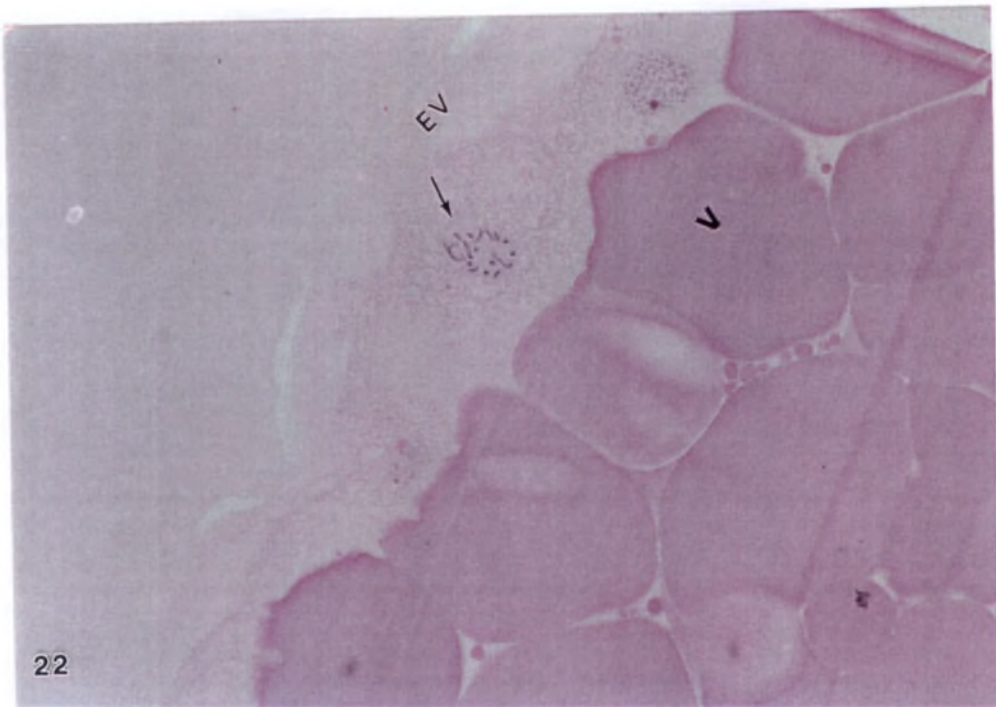
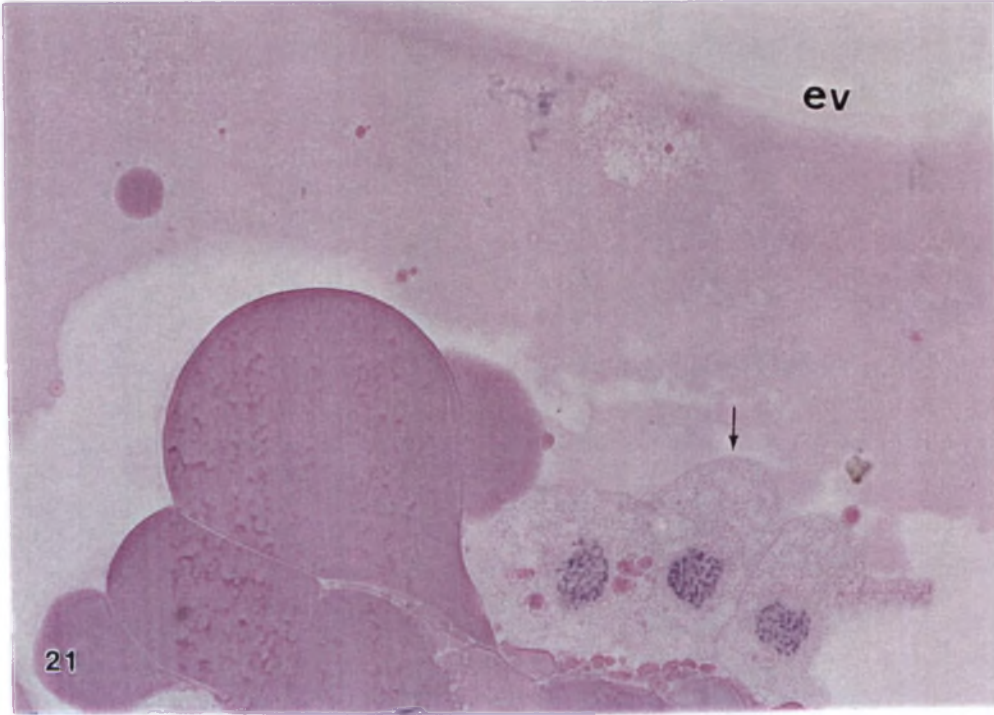


Figura 23 – Corte corado em H.E., evidenciando as células da blastoderme, com limites já definidos (→) e núcleo central (▶), envoltório vitelínico (→).

Figura 24 – Ultraestrutura de célula da blastoderme evidenciando o núcleo (n) limite celular (→) e citoplasma com granulações eletrodensas (▶). Barra igual 1µm.

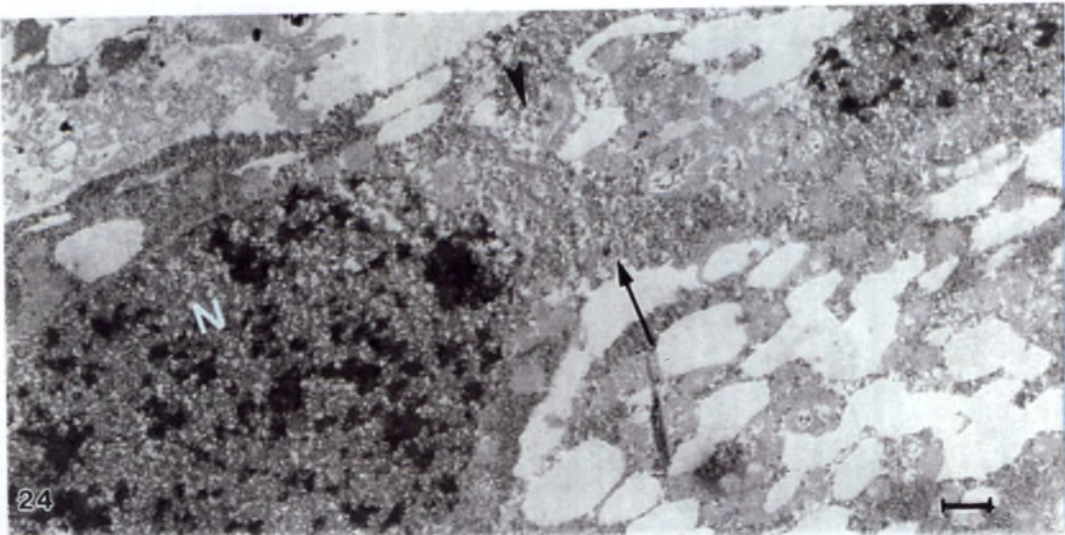
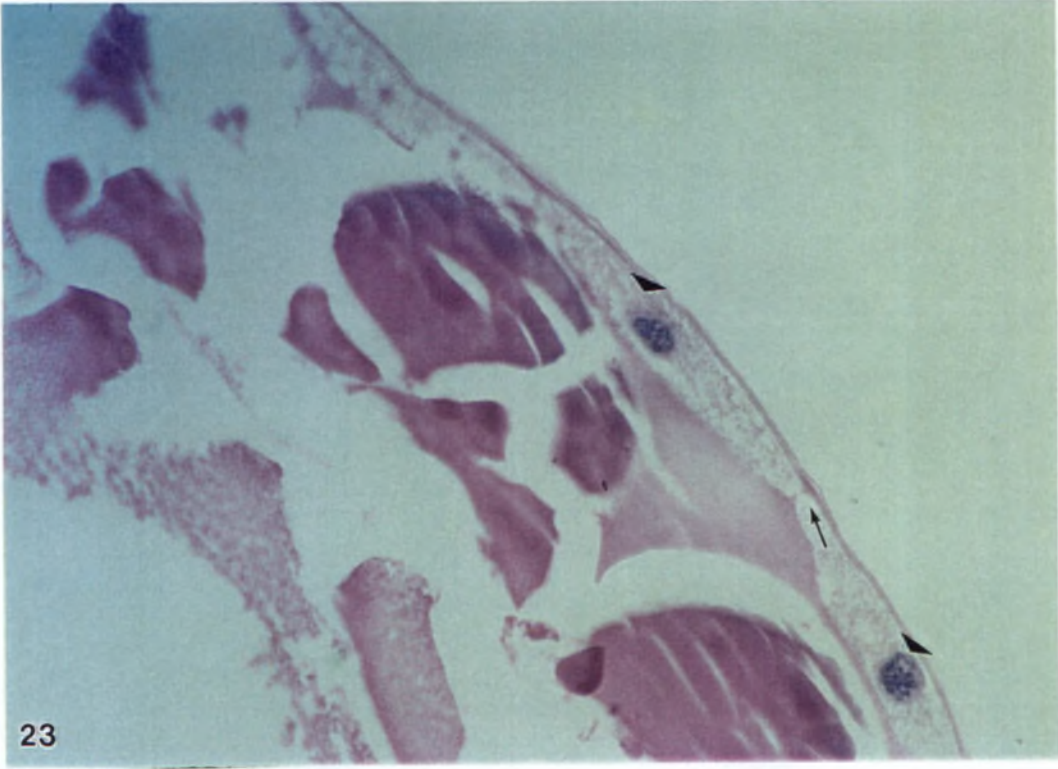


Figura 25 – Corte tratado por PAS evidenciando granulação presente no citoplasma (→) da célula da blastoderme. O envoltório vitelínico tem reação negativa ao PAS (▶), aumento de 400x.

Figura 26 – Imagem de célula da blastoderme tratada com faloidina. Observar o arranjo dos microfilamentos de actina (→) no citoplasma distribuídos radialmente, aumento 400x.

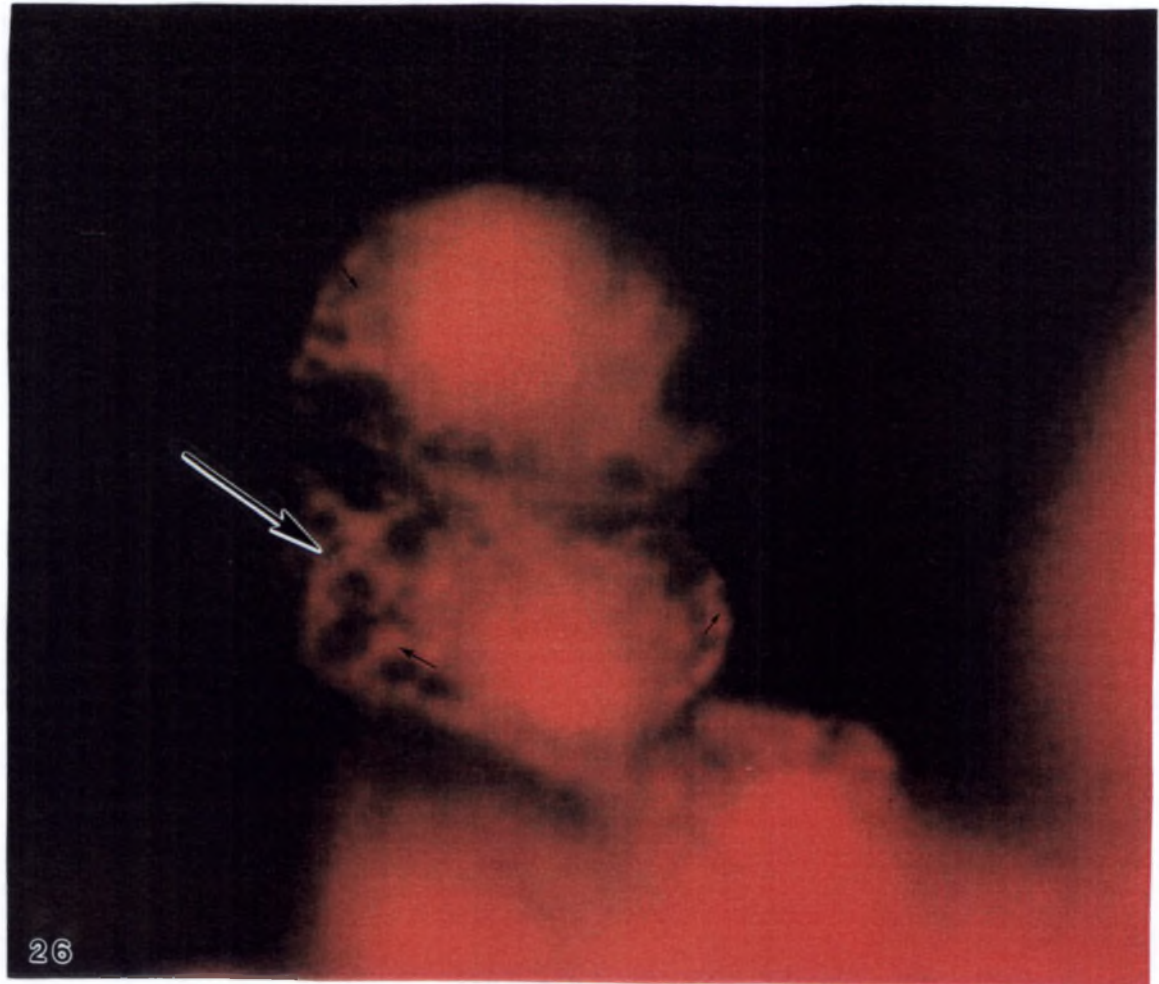
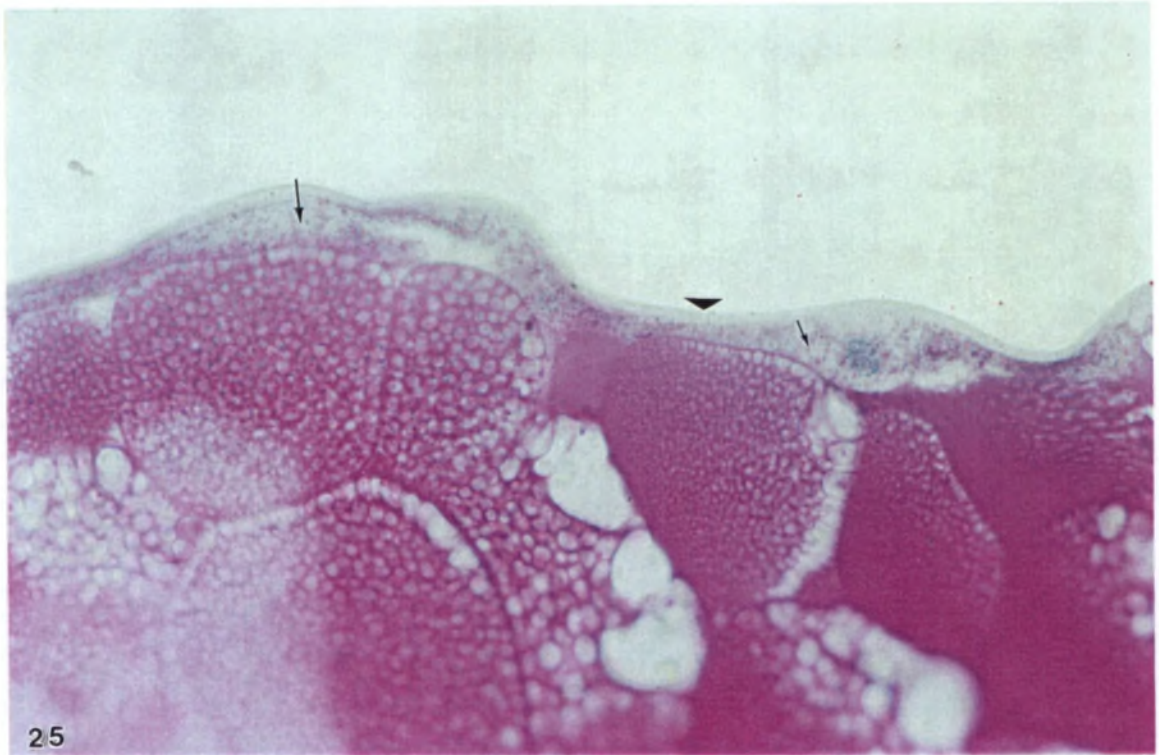


Figura 27 – Corte de blástula corado em H.E. evidenciando os vitelócitos (→) rodeados pelos grânulos de vitelo (▶). O envoltório vitelínico se apresenta como uma faixa contínua (e v), localizado abaixo do córion (c), aumento 400x.

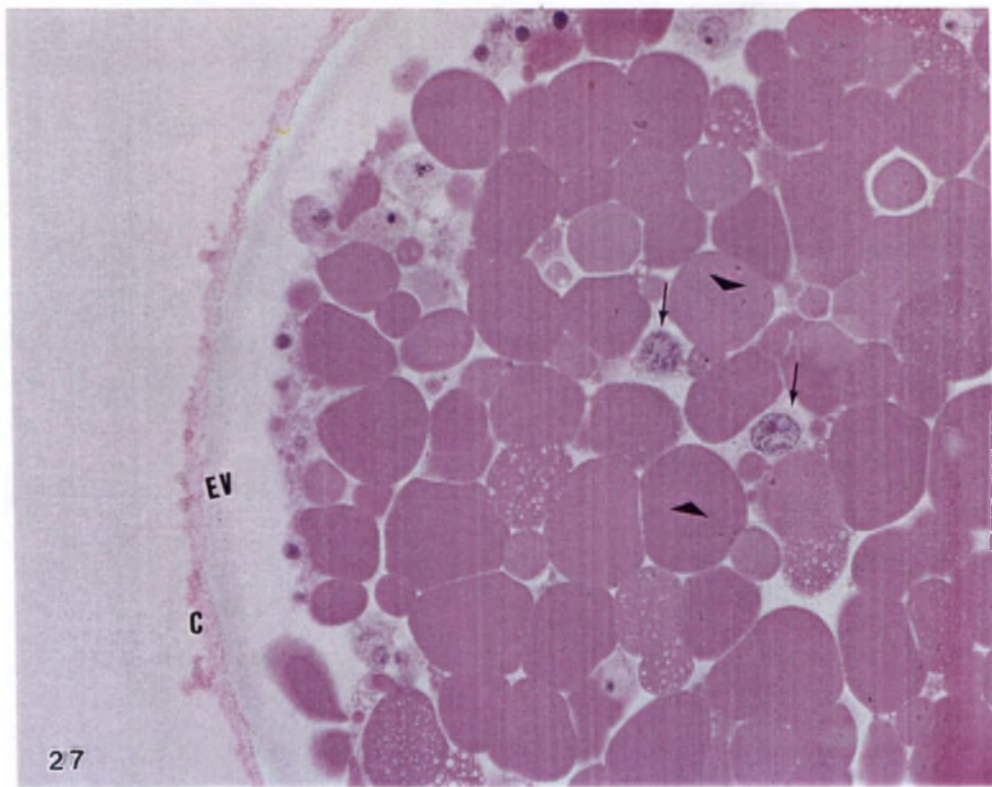


Figura 28 – Ultraestrutura de vitelócito em região mais central, entre grânulos de vitelo (v). Observar núcleo grande (N) com nucléolo (n) e citoplasma bastante vacuolado (c). Barra igual 2 μ m.

Figura 29 – Eletronmicrografia de superfície de embrião. Observar: córion (c), com camada contínua e grânulos, envoltório vitelínico com linha eletrondensa (\rightarrow), e uma camada larga com grânulos eletrondensos (\blacktriangleright). Barra 500 nm.

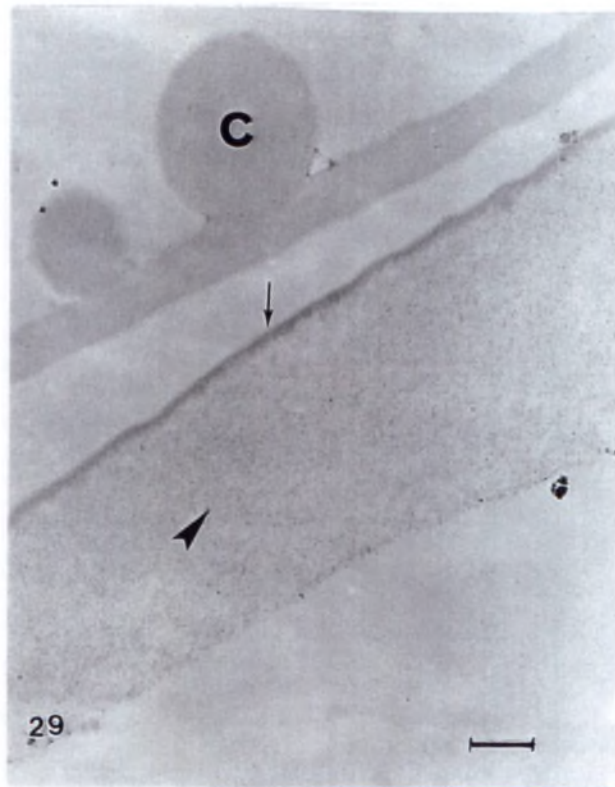
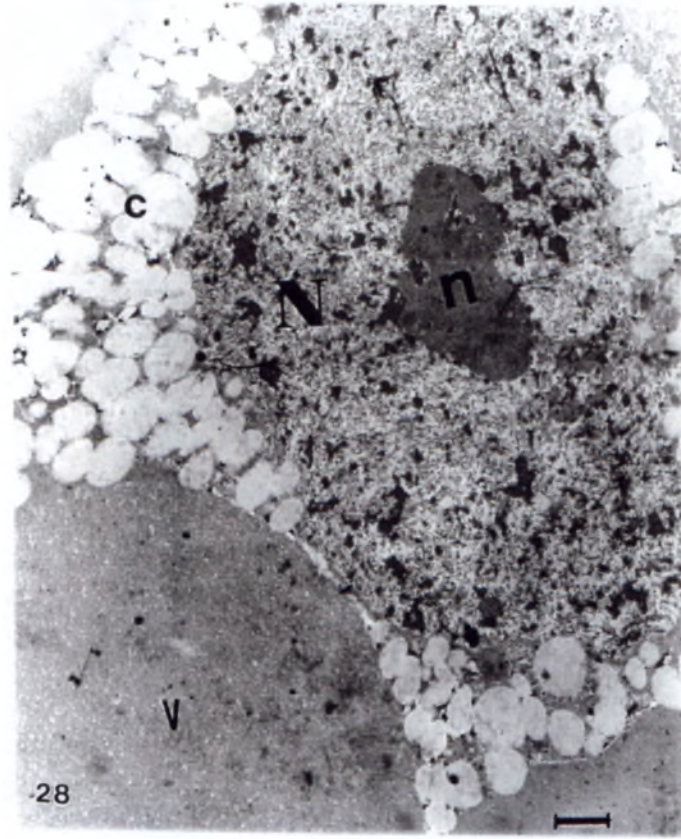


Figura 30 - Corte de blástula corado em H.E. evidenciando a multiplicação de células após a formação da blastoderme (→), grânulos de vitelo homogêneos (*), eosinófilos e grânulos vacuolados (v). Espaços claros (e) e vacúolos de grânulos maiores parecem corresponder a imagem negativa do lipídeo, aumento 400x.

Figura 31 – Corte corado em H.E., inclusão em parafina, células no estágio de contração da blástula estão formando o disco germinativo (→), vitelo (v) no pólo oposto perde o aspecto granular, aumento 200x.

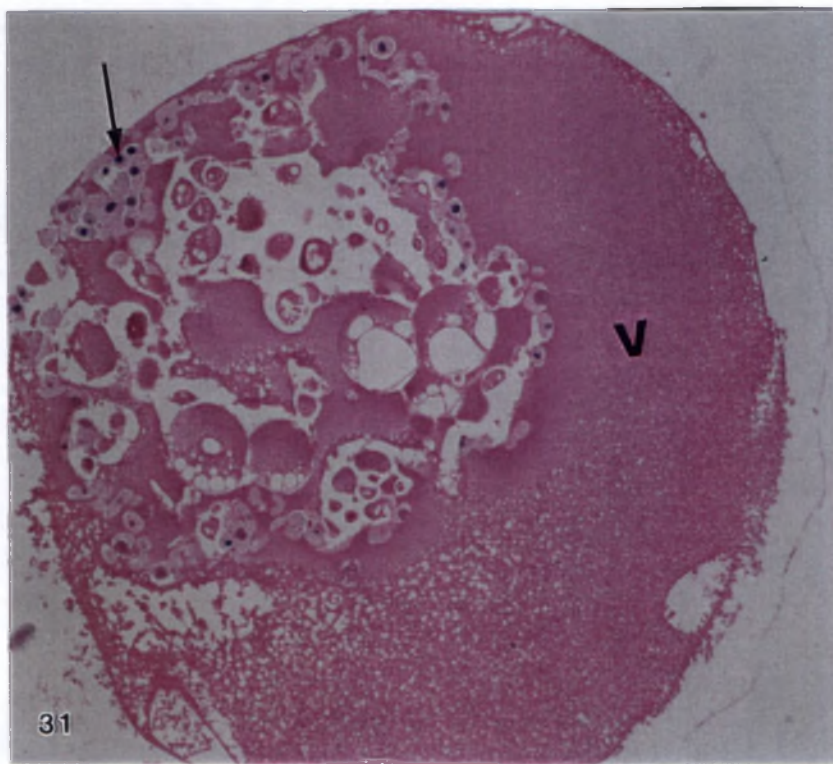
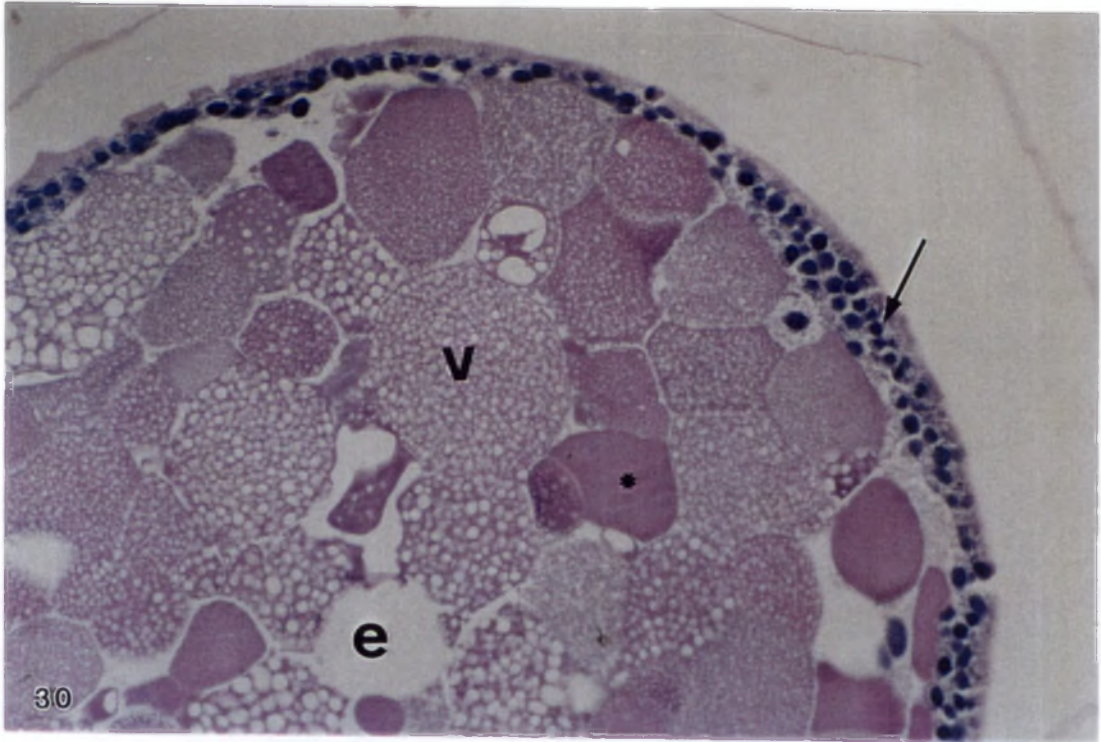
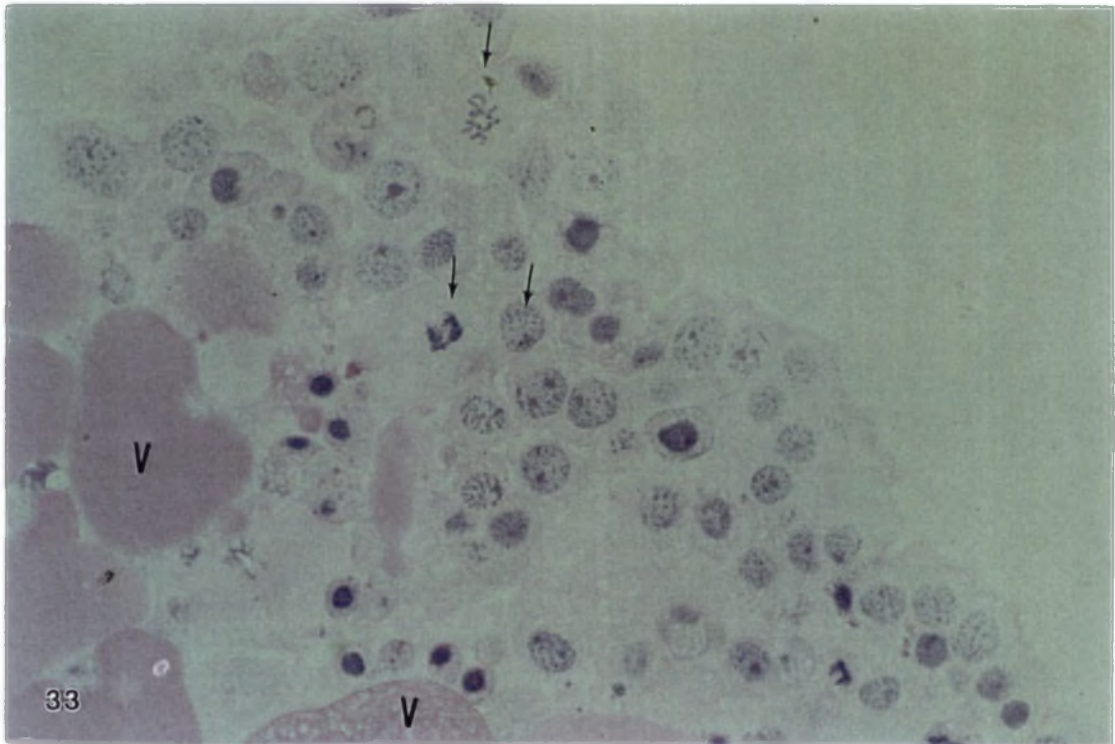
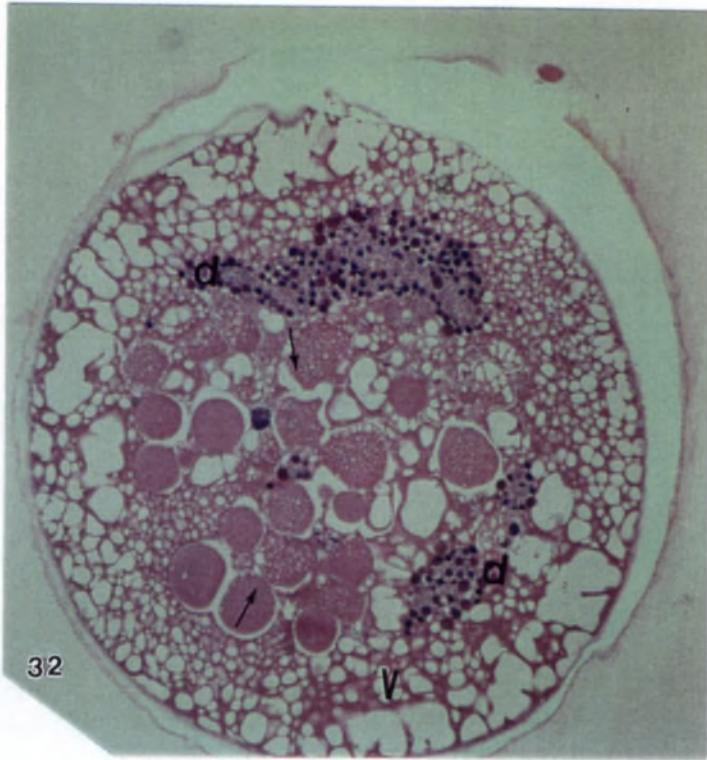


Figura 32 - Corte corado em H.E., inclusão em parafina. Os dois conjuntos de células (d) representam corte transversal do disco germinativo. O vitelo começa a apresentar novamente aspecto granular (→) enquanto a porção mais afastada do disco germinativo apresenta-se como massa vacuolada (v), aumento 100x.

Figura 33 – Corte de embrião em estágio mais avançado evidenciando as divisões celulares ocorridas durante a gastrulação (→). O vitelo próximo às células apresenta grânulos de aspecto variado (v), aumento 1000x.



DISCUSSÃO

No momento da oviposição os ovos de *Loxosceles intermedia* estão envoltos por um líquido viscoso e transparente. Estes ovos apresentam o córion composto de grânulos esféricos presos a uma banda contínua ao redor do ovo. Os grânulos mostram reação negativa ao PAS o que sugere que possam conter carboidratos sulfatados.

Os ovos de insetos que pertencem à família Acrididae possuem uma camada acima do córion que é constituído por um material amorfo e mucoso que também apresenta reação negativa ao PAS, (Viscuso, 1984). No inseto esse material vai gradualmente desaparecendo. Além dessa camada mucosa, existe uma outra camada constituída inteiramente por grânulos proteínáceos que permanecem na superfície o ovo até a eclosão.

Nos ovos de *Loxosceles intermedia* o córion também é constituído por componentes proteínáceos, pois se cora intensamente pela eosina, e permanecendo até o momento da eclosão. Ao microscópio de varredura o córion de *L. intermedia* apresenta grânulos de vários tamanhos; Humphreys (1983) analisou o córion de quatorze espécies de aranhas pertencentes a oito famílias e constatou que este aspecto granular do córion parece ser comum nas aranhas. Os ovos de *Pholcus phalangioides* (Pholcidae) apresentam uma distribuição dos grânulos do córion muito parecida com que foi observado em *L. intermedia*.

Uma característica marcante dos ovos dos artrópodes é a de possuir duas camadas de revestimento: o córion e a membrana vitelínica. O córion é uma camada

que funciona como uma barreira de proteção entre o ovo e meio. Sua constituição pode variar quando se compara diversos grupos de insetos, crustáceos e aranhas. Esse padrão foi observado em insetos *Lytta viridana*, por Sweeny e colaboradores (1967) Gerrity e colaboradores (1967) e Rempel e colaboradores (1965); em *Drosophila sp*, por Pascucci e colaboradores (1996); em *E. plorans* por Viscuso (1984), e em insetos que pertencem à ordem Phastodea, que apresentam envoltórios altamente resistentes, por Massimo e colaboradores,(1993).

Gerrity (1967) observou que nos ovos de *Lytta viridana*, nos primeiros minutos após a oviposição, o envoltório vitelínico apresenta diversos poros e à medida que ocorre o desenvolvimento ele vai tomando um aspecto mais uniforme.

Os ovos de aranhas são também envoltos por duas camadas uma interna, a membrana vitelínica e uma externa o córion (Foelix, 1982). Esse padrão de revestimento é seguido na espécie *L. intermedia*.

Suzuki e Kondo (1994) observaram a ultraestrutura da membrana vitelínica de *A. japonica* sendo uma faixa contínua, contendo duas partes distintas, uma fina camada eletrodensa mais externa, logo abaixo uma outra camada mais larga menos eletrodensa contendo fibrilas a qual ele chamou de camada principal.

Em *L. intermedia* ocorre uma estrutura semelhante, sendo a membrana vitelínica constituída por uma faixa bastante eletrodensa e, abaixo dela, apresentando uma camada menos eletrodensa. Porém não foi possível visualizar nenhum material fibrilar apenas grânulos eletrodensos.

Rempel (1957) sugere que o controle da entrada do espermatozóide deve ser feito pela membrana vitelínica já que ele passa sem grandes dificuldades pelo córion e, segundo alguns autores, pode atravessar a abertura ou, micrópila, existente no

córion os métodos que utilizamos não foi possível observar a presença de micrópila em ovos de *L. intermedia*. Holm (1952) sugere que a fixação obstrui esta abertura que pode ser comprovada em ovos vivos. Na aranha *Latrodectus mactans* nas primeiras horas após a oviposição a membrana vitelínica está fortemente aderida ao periplasma e ao córion (Rempel, 1957). A ocorrência de mudanças na membrana vitelínica não é observado apenas em aranhas, mas também em outros artrópodos. Em *L. intermedia* no momento da oviposição a membrana vitelínica não é tão evidente provavelmente porque ainda não tenham ocorrido as reações corticais que transformam a membrana de fertilização em membrana vitelínica, ou porque o fato de estar praticamente aderida ao córion dificulta sua visualização. Como não pudemos visualizar os núcleos, masculino e feminino em ovos coletados no momento da postura, não podemos afirmar que a fertilização já esteja completada. Não existem ainda dados sobre o local e modo de fertilização em aranhas do gênero *Loxosceles*.

Montgomery (1909) e Rempel (1957) observaram que em *Theridium* e *Latrodectus mactans*, a fusão dos prónucleos masculino e feminino ocorre aproximadamente quatro horas após a oviposição. A observação de membrana vitelínica mais espessa com duas camadas distintas em embriões coletados algumas horas após a oviposição sugere que este envoltório sofre transformações semelhantes às descritas em ovos que resultam na formação de membrana de fertilização e conseqüente bloqueio a poliespermia. A partir destes estágios o córion fica mais afastado e pode ser facilmente removido no material fixado.

Suzuki (1995) descreve presença do núcleo de espermatozóide dentro do ovo localizado ainda no oviduto, sugerindo que lá tenha ocorrido a fertilização. No

entanto, a maioria dos autores relata a fertilização ocorrendo algumas horas após a oviposição. No intervalo, o ovócito deve completar sua divisão meiótica, o que não nos foi possível observar mesmo utilizando cortes seriados dos ovos recém-postos.

No momento da oviposição os ovos de *L. intermedia* estão envoltos por um líquido viscoso e transparente o que é um indicativo de que a postura ocorreu há poucas horas. Aproximadamente vinte quatro horas após a postura esse líquido evapora e os ovos tornam-se individualizados. Rempel (1957) observou que os ovos de *Latrodectus mactans*, durante a oviposição, também apresentam um fluido alcalino, viscoso, contendo pequenos grânulos em suspensão, e à medida que ocorre o desenvolvimento, esse líquido evapora e os grânulos em suspensão aderem ao córion. O mesmo pode ocorrer em *L. intermedia*, pois se observou a presença de grânulos de tamanhos variados no córion.

Os ovos da aranha *L. intermedia* são do tipo centrolécito, isto é, o vitelo está localizado no centro do citoplasma. Outros grupos de artrópodos como a *Ephemera japonica*, (insecta) (Tojo e Machida 1998); *Macrobrachium acanthurus*, (crustácea) (Bressan e Müller, 1997) também apresentam esta disposição central do vitelo.

Gilbert (1994) observa que o vitelo pode influenciar o padrão de clivagem de uma espécie aliado a outros fatores, uma vez que presença dele em grande quantidade pode impedir a divisão total do ovo.

Em nossas observações foi possível notar que, à medida em que ocorre o desenvolvimento, o vitelo sofre rearranjo, o que sugere que de alguma forma o vitelo possa estar influenciando as segmentações sofridas pelo ovo de modo que ainda desconhecemos.

A clivagem de *L. intermedia* é do tipo superficial, ou seja, os núcleos se dividem no centro do ovo e migram para a periferia. Wolf (1976) e Gilbert (1997) chamam o conjunto formado pelo citoplasma e os núcleos de clivagem de enérgides, que são mantidos em associação devido à interação com os microfilamentos e microtubulos. Este deve ser o caso nos embriões de *L. intermedia*, pois mesmo quando os núcleos ainda estão localizados mais centralmente foi possível observar a clara delimitação de região citoplasmática correspondente a cada célula, apesar de não se evidenciar ultraestruturalmente presença de membrana plasmática.

A participação dos microfilamentos e microtúbululos na formação da blastoderme celular foi investigado por vários autores como Takesue e colaboradores (1985) e Karr e Alberts, (1986). Warn e Margrath (1983) observaram que os microfilamentos de actina estão presentes desde as primeiras divisões de clivagem e ao se formarem as células da blastoderme esses microfilamentos possuem um arranjo difuso radial. Em nossas observações obtivemos resultados semelhantes: os feixes de microfilamentos de actina se apresentavam dispostos em várias direções nas células da blastoderme. Não nos foi possível visualizar os microfilamentos de actina nos diferentes estágios de desenvolvimento devido às dificuldades de manuseio, visto que a maior parte do ovo é preenchida por vitelo. Com o aprimoramento da técnica, o estudo da interação do citoesqueleto em estágios iniciais e na formação da blastoderme pode ser um objeto de estudo muito interessante no futuro, contribuindo para elucidação da dinâmica celular nestas etapas do desenvolvimento e apontando modos de interferência nelas.

Quando os núcleos atingem a superfície tem início a formação da blastoderme sincicial e, imediatamente após, a blastoderme celular. Estas células

são achatadas e possuem núcleos grandes. Takesue e colaboradores (1980) relatam que em *Bombyx mori* é possível visualizar microprojeções na superfície do ovo quando os núcleos chegam à superfície. Em *L. intermedia* não foi visualizado nada semelhante, pois a superfície do ovo se apresentou lisa em todo o desenvolvimento. Esse processo é relativamente longo se comparado com outras aranhas. Susuki e Kondo (1995), relatam que em *A. japonica* a blastoderme ocorre dezesseis horas após a oviposição enquanto que; Rempel (1957) observou, em *Latrodectus mactans* a blastoderme ocorrendo vinte cinco horas após a oviposição. Em nossas observações, o que pudemos notar é que, a blastoderme ocorre aproximadamente em 100 horas. Para outros artrópodos como, por exemplo, as abelhas, a blastoderme forma-se trinta horas após a oviposição sendo que os autores Fleig e Sander (1985) consideram este um período longo. Em outros artrópodos o tempo requerido para a formação da blastoderme é bem curto como por exemplo, para *Bombyx mori* 9-10 horas (Takesue e colaboradores, 1980); para *Ephemera japonica* 5-6 horas (Tojo e Machida, 1998) para *Ctnolepisma lineata* 12 - 16 horas (Woodland, 1957) para *Pedetontus unimaculatus*, 11-12 horas (Machida e colaboradores, 1990) e *Lepidocampa weberi* aproximadamente 72 horas (Ikeda e Machida, 1998).

O padrão de clivagem superficial é seguido na maioria dos artrópodos e já foi observado em insetos como, por exemplo, *Lytta viridana* (Sweeny et al., 1967) e *Ephemera japonica* (Tojo & Machida, 1998) e *Drosophila sp* (Turner e Mahowald, 1976) e *Lepidocampa weberi* (Ikeda e Machida, 1998) e em *Ctnolepisma lineata* (Woodland, 1957). Existem relatos desse tipo de segmentação nas aranhas

Latrodectus mactans (Rempel, 1957), *Ummidia fragaria* (Yoshikura, 1972), *Theridium tepidariorum*, (Montgomery, 1909), e *Agelena labyrinthica* (Holm, 1952).

Porém em outros insetos e também outros artrópodos como ácaros, crustáceos e até mesmo algumas espécies de aranhas o padrão de clivagem pode ser um pouco modificado.

Takesue e colaboradores (1980) relatam que, no desenvolvimento embrionário de *Bombyx mori*, não ocorre a formação da blastoderme sincicial, sendo que os núcleos, juntamente com o seu citoplasma, chegam à periferia do ovo e empurram o periplasma. Ocorre uma associação entre o citoplasma do núcleo e o periplasma e começa a se formar a blastoderme. Algumas espécies de crustáceos, como o *Macrobrachium carcinus*, seguem o padrão de clivagem superficial até o estágio de dezesseis células, entre os estágios de dezesseis a trinta e duas células seguem o padrão da segmentação total, permanecendo assim até o estágio de cento e vinte e oito células, no qual não se visualizam os limites celulares e o desenvolvimento embrionário segue o modelo de segmentação superficial (Muller, 1984). Um tipo de segmentação parecido com este é descrito por Machida e colaboradores (1990) em *Pedetontus unimaculatus* em que, até o estágio de quinhentos núcleos, a clivagem é do tipo total. A partir desse estágio ocorre a transição para o tipo de clivagem superficial, na qual os núcleos que chegaram até a periferia se dividem. Quando houver mil núcleos, aproximadamente, forma-se uma única membrana interna entre o vitelo e a blastoderme.

Gotoh e colaboradores (1994) relatam que em ácaros também as divisões iniciais são totais e iguais, sendo que a partir da terceira divisão elas passam a ser superficiais, e que os embriões de ácaros tem o seu desenvolvimento bloqueado no

estágio de blástula. Esse fenômeno é chamado de diapausa. Essa característica do desenvolvimento de ácaros não foi observado em embriões de *L. intermedia* que uma vez colocados em parafina líquida tiveram o seu desenvolvimento normal até o estágio de pré-larva e que no ambiente desenvolve-se de forma contínua.

Suzuki e Kondo (1995) relatam que no desenvolvimento embrionário inicial da aranha *A. japonica*, devido às invaginações das membranas celulares e ao arranjo piramidal do vitelo, ocorre um tipo especial de segmentação total. Todavia em nossas observações foi possível visualizar o arranjo piramidal. Entretanto, nenhuma delimitação de membrana foi visualizada, como pode ser comprovado na imagem da figura número dezenove. Portanto, não é possível dizer que ocorre nesta aranha qualquer etapa de segmentação total.

Durante o desenvolvimento embrionário de aranhas vários autores se referem a um tipo de célula que permanece no vitelo, o vitelócito, (Montgomery 1909; Holm 1952, Rempel 1957, Lambert 1909) e que segundo alguns autores, engloba ativamente o vitelo. Os autores referem-se a estas células como derivados da blastoderme da qual se desprendem. Nossas observações estão mais de acordo com as de Holm (1952) que descreve as “células de vitelo” como resultantes de núcleos que permanecem em localização mais central, mergulhados em porções remanescentes de citoplasma. Não foi possível observar delimitações de membrana plasmática nessas células, mas pudemos claramente observá-las em regiões bem centrais do embrião, quando a blastoderme estava recém-formada constituindo-se em uma só camada de células, sendo, portanto, pouco provável que o vitelócito observado tivesse se destacado da blastoderme e migrado toda a extensão até o interior do vitelo. Este tipo celular apresenta características morfológicas muito

distintas das células do disco germinativo e representa objeto interessante de estudos futuros.

Assim que a blastoderme é formada dá-se início a um outro estágio que os autores chamam de contração da blástula. Suzuki e Kondo (1994) dividem a contração da blástula em duas partes: primeiro a contração do vitelo seguido da contração da blastoderme. Yoshikura (1972) descreve para *Ummidia fragaria* que à medida que ocorre a contração ocorre o aparecimento de um líquido claro, o qual Foelix (1982) chama de líquido perivitelínico e à medida que as células se dirigem para um dos pólos do ovo a quantidade de líquido perivitelínico fica mais evidente. Em nossas observações foi possível visualizar este estágio quando os embriões estavam mergulhados na parafina líquida, (figuras números cinco e seis respectivamente) meio no qual o córion fica completamente transparente e permite a observação do embrião vivo, total.

Suzuki e Kondo (1995) relatam que a concentração das células da blastoderme no estágio da contração da blástula pode estar relacionado com a formação das células do disco germinativo. Em nossas observações de embriões em parafina líquida pudemos seguir a movimentação que resulta na concentração das células num dos pólos do ovo, e o deslocamento do vitelo para a área restante. Em cortes, observamos que as células localizadas como uma banda que repousa sobre o vitelo constituem o disco germinativo.

Assim que é formado o disco germinativo, as células perdem suas características das células da blastoderme que eram achatadas e adquirem características celulares próprias. Em *A. japonica* as células passam a ser esféricas e ficam no pólo superior do ovo (Suzuki e Kondo, 1995) enquanto que, em

Latrodectus mactans as células que eram achatadas passam a ter a forma colunar (Rempel, 1957).

Em *L. intermedia* as células que eram achatadas na blastoderme (ver figura vinte e três) passam a ser esféricas, com núcleos com intensa basofilia e, citoplasma eosinófilo (ver figuras trinta e um e trinta e dois). Estas células continuam a se dividir dando continuidade à gastrulação, com aparecimento dos folhetos germinativos e demais etapas de desenvolvimento. A descrição destas etapas, a partir da formação do disco germinativo, não estavam, nos objetivos deste trabalho e deverão ser estudadas futuramente.

CONCLUSÕES

O estudo da análise dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário da aranha marrom *Loxosceles intermedia* permiti-nos estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) Os ovos de *L. intermedia* são envoltos por duas camadas: o córion e o envoltório vitelínico que funcionam como barreiras de proteção e permanecem íntegros até o momento da eclosão
- 2) Os ovos de *L. intermedia* são do tipo centrolécito, ou seja, caracterizam-se por possuírem vitelo localizado no centro, rodeado por citoplasma que ocupa a periferia e que se projeta em raios para o centro do ovo.
- 3) O tipo de clivagem que ocorre em *L. intermedia* é superficial, pois, a grande massa de vitelo, de localização central, limita a clivagem à margem citoplasmática do ovo.
- 4) O vitelo durante os estágios de desenvolvimento sofre vários rearranjos, mudando a forma dos grânulos bem como a organização destes.
- 5) O maior número de posturas de *L. intermedia* ocorre entre os meses de novembro a março, quando temperatura ambiental é alta.
- 6) Quando as fêmeas são mantidas a uma temperatura média de 26°C, em condições ideais de umidade e alimentação, elas realizam postura normalmente durante todo ano.

7) Ovos coletados numa mesma postura podem apresentar-se em estágios diferentes de desenvolvimento.

8) Usando a parafina líquida foi possível constatar que os ovos de *L. intermedia* mergulhados nesse meio continuaram a se desenvolver normalmente até o estágio de pré-larva.

9) Diferentes aspectos estruturais de um mesmo material puderam ser observados de acordo com o meio de inclusão utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B; BRAY D; LEWIS J; RAFF M; ROBERTS K; WATSON D. J; **Biologia molecular da célula**. 3. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- BARNER D. R. & RUPPERT E. E. **Zoologia dos Invertebrados** 6º ED. Roca, São Paulo pp 606-655.
- BRESSAN, C. M. & MÜLLER, Y.M. R; Characterization of Embryonized Naupilus Development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustácea, Decápoda). **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 14, n.2, 243 – 246, 1997.
- BROWDER, L. W; ERICKSON A. C; JEFFERY R.W; **Developmental Biology**. 3. ed., Saunders College Publishing, 1991.
- BUCKUP, E. H. Variação interpopulacional dos receptáculos seminais em aranhas do grupo Spadicea do gênero *Loxosceles* HEINECKEN & LOWE, 1832 (Araneae, Scytodidae). **Iheringia. Ser. Zool**, Porto Alegre, v. 55, n. 137, p. 147, 1980.
- BUCZEK, A. Influence of high relative humidity on course of embryonic development and hatch of *Argas (A.) reflexus* (Fabricius, 1794) **Angew. Zoologie**, nº 4, p.339-443, 1991.
- CADERNOS DE SAUDE: *Loxosceles*: “aranha –marrom”. Ano I, nº 2. Prefeitura da cidade de Curitiba, 1993.
- COOPER, A. J Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. **J. Cell Biol.**, v.105, 1473-1478, 1987.

CUTLER, B. Egg chorion microspheres in *Lyssomanes viridis* (Araneae, Salticidae, Lyssomaninae), unique features in an unusual jumping spider, **Revue Arachologique**, 9 (2), p. 21-27, 1990.

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

FISCHER, L. M.. Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* HEINECKEN & LOWE, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 38, pp. 63-88, 1994.

FLEIG, R. & SANDER K. Blastoderm development in honey bee embryogenesis as seen in the scanning electron microscope. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**, 8, 279-286, 1985.

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

GALIANO, M. E. Ciclo biológico y desarrollo de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Scytodidae). **Acta Zool. Lilloana**. v. XXIII, p. 431-465, 1967.

GARCIA, L. M. S & GARCIA, F. C., **Embriologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, p. 106-107.

GERRITY, R. G; REMPEL, J.G; SWEENEY R.P; The embryology of *Lytta viridana* Le conte (Coleoptera:Meloidae). II, The structure of the vitelline membrane. **Can. J. Zool.** v. 45, 497-509, 1967.

GILBERT, F.S. **Development Biology**, editora Sinauer Associates, INC, P.º Box 407, Massachusetts, U.S.A., 1997

GILBERT F. S. & RAUNIO, M. A. **Embryology**, editora Sinauer Associates INC. Publishers Sunderland, U.S.A., 1997.

GILBERT, F. S. **Biologia do Desenvolvimento**, Sociedade Brasileira de Genética, p.134, 1994

GOTOH, T. KAMOTO. T; HATAKEYAMA M; GOMI K; Embryonic development and diapause stage in *Panonychus* mites (Acari: Tetranychidae). **Appl. Entomol. Zool.** v. 29, n. 04, p. 507-515, 1994.

HOLM, A. Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung und entwicklungsphysiologie des Spinnenembryos. **Zool. Bidrag Uppsala.** v. 29, p. 293-424, 1952.

HUMPHREYS, F.W. The surface of spiders'eggs. **J. Zool. London**, v. 200, p.303 -316, 1983.

IKEDA Y & MACHIDA R. Embryogenesis of the Dipluran *Lepidocampa weberi* Oudemans (Hexpoda, Diplura, Campodeidae); External Morphology, **J. Morphol.** v. 237, p. 101-115, 1998.

KARR, T. L.; ALBERTS, B. M. Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos. **J. Cell Biol.** v. 103, p. 1494-1509, 1986.

LAMBERT, A. E. History of the procephalic lobes of *Epeira cinerea*. A study in arachnid embryology. **J. Morphol.** v. XX, n. 03, p. 413-461, 1909.

LUCAS, S; Loxoscelismo: Relato de um acidente humano atribuído a *Loxosceles amazônica*. Gertsch, 1967 (Araneae, Sytrodidae, Loxoscelinae) (Hemíptera reduviade) **Mem. Inst. Butatan**, 47/48: p. 127-131, 1983/84.

MACHIDA, R; NAGASHIMA T; ANDO T; The early Embryonic Development of the Jumping Bristletail *Pedetontus unimaculatus* Machida (Hexapoda: Microcoryphia, Machilidae), **J. Morphol.** v. 206, p. 181-195, 1990.

MAZZINI, M; CARCUPINO M; FAUSTO M.A; Egg chorion architecture in stick insects (Phasmatodea), **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** V. 22, pp. 391-415, 1993.

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

MONTGOMERY JUNIOR, T. H. The development of theridium, an aranead, up to the stage of reversion. **J. Morphol.** v. XX, n. 02, p. 298-351, 1909.

MORISHITA, R. Detecção da atividade da fosfatase alcalina no ovário de *Loxosceles intermedia*. Curitiba, 2000. 85f. Monografia (Bacharelado em Biologia Celular) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MÜLLER, R.M.I. The Embryonic Development of *Macrobrachium carcinus* (L.) **Zool. Jb. Anat.** 112 51-78, 1984.

MYASHITA, K. Development and egg sac production of *Achaearanea tepidariorum* (C.L. KOCH) (Araneae, theridiidae) under long and short photoperiods, **J.Arachnol.**,15:51-58,1987.

PASCUCCI T; PERRINO J; MAHOWALD P.A; WARING L.G;. Eggshell assembly in *Drosophila*: Processing and localization of membrane and chorion proteins. **Development Biology** 177, 590-598, 1996.

PAZ, N. S. Aspectos de la biologia reproductiva de *Linothele megatheloides* (araneae:dipluridae). **J. Arachnol.**, 21: 40-49, 1993.

PLATNICK, N. I.; CODDINGTON, J. A.; FORSTER, R. R.; GRISWOLD, C. E. Spinneret morphology and phylogeny of Haplogyne Spiders (Araneae, Araneomorphae). **Am. Museum of Natural History**, New York, v. 3016, p. 1-73, 1991.

REMPEL, J. C.; CHURCH, N. S. The embryology of *Lytta viridana* Le conte (Coleoptera: Meloidae). I. Maturation, fertilization, and cleavage. **Can. J. Zool.** v. 43, p. 915-925, 1965.

REMPEL, J. C. The embryology of black widow spider. *Latrodectus mactans* (Fabr.). **Can. J. Zool.**, v.35, p 35-57, 1957.

SHENONE, H e LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Bol. Chile. Parasit.**, 30: p.27-29, 1975.

SUZUKI, H. Fertilization occurs internally in the spider *Achaeearanea tepidariorum* (C. Koch). **Inv. Reprod. Dev.** v. 28, n. 03, p. 211-214, 1995

SUZUKI, H., KONDO, A. Early embryonic development, including germ-disk stage, in the Theridiid spider *Achaeearanea tepidariorum*. **J. Morphol.** v 224, p. 147-157, 1995.

_____. _____. The second maturation division and fertilization in the spider *Achaeearanea japonica* (Bös. Et Str.) **Zool. Science.** v. 11, p. 433-439, 1994.

SWEENEY, R.P; CHURCH, S. N; REMPEL, G.J; GERRITY, G.R; The embryology of *Lytta viridana* Le conte (Coleoptera: Meloidae). III. The structure of the chorion e micropyles. **Can. J. Zool.** v. 46, 213 – 217, 1967.

TAKESUE, S; OWARIBE K; KEINO H; Possible involvement of cytoskeletal organelles in blastoderm formation of the silkwom, *Bombyx mori*, **Internacional Journal of Invertebrate Reproduction an Development**, v. 8, 287-292, 1985.

TAKESUE, S; KEINO H; ONITAKE K; Blastoderm formation in the silkworm egg (*Bombyx mori* L.), **J. Embryol. Exp. Morph.** **60**, pp 117-124, 1980.

TOJO K & MACHIDA R, Early Embryonic Development of the Mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta: Ephemeroptera, Ephemeridae) **Journal of Morphology** **238**: 327-335, 1998.

TURNER F. R & MAHOWALD A. P. Scanning Electron Microscopy of *Drosophila* Embriogenesis. **Development Biology** **50**, 95-108, 1976.

VALENTE, M. M. Estudo anátomo-histológico do aparelho genital da fêmea de *Ramphobetus sorocabe*, Mello Leitão, 1923 (Araneae, Aviculariidae), Dissertação de Mestrado, Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual Paulista , Botucatu, SP., 1984.

VAN LENTEREN, J. C. Fundamental knowledge about insect reproduction: essential to develop sustainable pest management. **Inv.Reprod. Develop.**, Philadelphia, v.36, pp. 1-15, 1999.

VISCUSO, R; LONGO G; SOTTILE L; Proposal for new term of definition for the so called “extrachorion” of the eggs of the orthoptera acrididae based on a study of its origin. **Arch. Biol. (Bruxelles)** **95**: 493-500 , 1984.

WARBURG, M. R.; Rosenberg, M. The reproductive system of female *Buthotus judaicus* (Scorpiones, Buthidae). **Biol. Struc. Morph.**, Paris, v.4, n.1, p.33-37, 1992.

WARN, R.M.; MAGRATH, R. F-actin distribution during the cellularization of the *Drosophila* embryo visualized with fl-phalloidin. **Exp. Cell Res.**, Sweden, v. 143, p. 103-114, 1983.

WOLF, R. The cytaster, a colchicine-sensitive migration organelle of cleavage nuclei in an insect egg. **Dev. Biol.** v. 62, p. 464-472, 1978.

WOODLAND, T. J. A contribution to our knowledge of Lepismatid development. **J. Morphol.** v. 101, p. 523 –577, 1957.

YOSHIKURA, M. Notes on the Development of Trap-door Spider, *Ummidia fragaria* (Doenitz), **Acta Arachnol.** v. XXIV, n. 01, p.29-29, 1972.