

ESTRATÉGIA REPRODUTIVA DA ARANHA-MARROM *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 e *L. laeta* (NICOLET, 1849): RESERVA ESPERMÁTICA NOS BULBOS COPULATÓRIOS

Reproductive strategy of the brown spider Loxosceles intermedia Mello-Leitão, 1934 and L. laeta (NICOLET, 1849): storage of spermatozoa in the male copulatory bulb

Marta Luciane Fischer¹; Vanessa de Oliveira Amaral²

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Paraná, Brasil.

²Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI_SESA-PR) , Paraná, Brasil.

Resumo

Introdução: As aranhas do gênero *Loxosceles* são caracterizadas como primitivas e haplóginas cujo aparelho reprodutor simples é destituído de epígino e hematodocha. A presente pesquisa partiu da hipótese de que a superpopulação de *L. intermedia*, em Curitiba, seja devido a mecanismos que maximizam o potencial reprodutivo habilitando o macho a cópulas múltiplas em sua curta existência sem necessidade de novos preenchimentos dos bulbos copulatórios. **Objetivo:** avaliar o efeito da interrupção da cópula na reserva de espermatozoides. **Metodologia:** Foram formados 30 casais de *L. intermedia* e 30 de *L. laeta* com machos e fêmeas virgens, 10 cópulas foram ininterruptas para ambas, enquanto para *L. intermedia* as cópulas foram interrompidas após 3 min e 15 min, e para *L. laeta* após a primeira e após a terceira inserção. Como controle foram analisados os bulbos copulatórios de 10 machos virgens. **Resultados:** Os machos virgens possuíam seus reservatórios preenchidos, enquanto bolhas de ar foram identificadas no reservatório espermático daqueles que copularam, entretanto embora mais bolhas tenham sido identificadas quanto maior tempo da cópula, não houve diferenças significativas entre os tempos de interrupção e a área da bolha. Todas as cópulas resultaram em ootecas, contudo a interrupção precoce impactou na produção de ovos férteis. **Conclusão:** Foi confirmada a hipótese de que o macho de *L. intermedia* não utiliza todos os espermatozoides armazenados, possibilitando fertilizar fêmeas sequenciais sem a necessidade de reabastecer o reservatório.

Palavras chave: Animais de interesse médico; Estratégia reprodutiva; Loxoscelismo; Pragas urbanas; Synsperium.

Abstract

Introduction: Spiders of the genus *Loxosceles* are characterized as primitive and haplogous whose simple reproductive apparatus is devoid of epigyne and hematodocha. The present research started from the hypothesis that the overpopulation of *L. intermedia* in Curitiba is due to mechanisms that maximize the reproductive potential enabling the male to have multiple copulations in his short existence. **Objective:** to evaluate the effect of interrupting copulation on the sperm reserve. **Methods:** Thirty couples of *L. intermedia* and 30 of *L. laeta* were formed with virgin males and females, 10 copulations were uninterrupted for both, while for *L. intermedia* the copulas were interrupted after 3 min and 15 min and for *L. laeta* after the first one. and after the third insertion. As a control, the copulatory bulbs of 10 virgin males were analyzed. **Results:** Virgin males had their reservoirs filled, while air bubbles were identified in the sperm reservoir of those who copulated, however, although more bubbles were identified the longer the mating time, there were no significant differences between interruption times and bubble area. All copulations resulted in eggsacs, however early interruption impacted the production of fertile eggs. **Conclusion:** The hypothesis that the male of *L. intermedia* does not use all the stored spermatozoa was confirmed, making it possible to fertilize sequential females without the need to replenish the reservoir.

Keywords: Animals of medical interest; Reproductive strategy; Loxoscelism; urban pests; synsperium.

Recebido em: 25-07-2022

Publicado em: 29-08-2023

Autor correspondente

Marta Luciane Fischer

Endereço: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

R. Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, Curitiba-Paraná

Email: marta.fischer@outlook.com

1. Introdução

A seleção sexual norteia a evolução das espécies se constituindo de uma diversidade de estratégias consolidadas na ocupação de nichos que compõe a biodiversidade. Dentre as estratégias, destaca-se a competição espermática cuja seleção pode se basear em parâmetros externos, como os recursos genéticos ou materiais ou ocorrer ocultamente no interior do corpo das fêmeas após a fecundação¹². As aranhas

apresentam processos complexos, ainda não totalmente conhecidos, pois como animais predadores demandam que o macho use de estratégias para promover a acinesia da fêmea³. Além disso, a propriedade de armazenar os espermatozoides em espermatecas, inclusive, de diferentes machos, conduzem a estratégias dos machos para maximizar as chances de a fêmea utilizar o seu material genético. Essas estratégias envolvem mecanismos de guarda e proteção da fêmea,

amplamente estudados em muitas espécies², ou envolvendo mecanismos de transferência espermática, cujo estudo morfológico está em consolidação⁴.

A estratégia adotada pelo macho deverá contemplar a adequação ao tipo de genitália da fêmea. As aranhas enteleginas, possuem um epígino formado por dois ductos simétricos, que armazenam os espermatozoides em um compartimento que os conduz para o local da fecundação, priorizando os que foram armazenados primeiro⁴. As aranhas primitivas como a aranha-marrom são haplóginas, não apresentam a placa esclerotizada sobre os orifícios genitais e possuem ductos que terminam em receptáculos de fundo cego, assim, espermatozoides que foram armazenados por último serão os primeiros a serem utilizados³. No primeiro caso, é mais efetivo para o macho amadurecer antes da fêmea e esperar a sua maturidade para copular antes de outros machos, enquanto que para as aranhas primitivas maior garantia de fecundidade está em atingir a maturidade ao mesmo tempo da fêmea e exibir tamanhos maiores para que após a fecundação, a proteja da cópula por outros machos³.

Os órgãos reprodutivos das aranhas são alojados na região ventral do abdome externalizados em uma abertura no centro do sulco epigástrico localizada entre os pulmões foliáceos³. Os espermatozoides são exsudatos em uma teia espermática e transpostos para um reservatório presente na extremidade dos pedipalpos formado por um bulbo contendo ducto espiralado que se prolonga em um estilete similar a um êmbolo de uma pipeta³. Assim, como a genitália feminina, os machos primitivos possuem estruturas simples e desprovida da hematodocha³. Embora os

espermatozoides sejam células flageladas móveis, são mantidos inativos durante a fase de produção e transferência do bulbo para o receptáculo da fêmea⁴. Os processos, fluídos e estratégias estão começando a ser desvendados, contudo já é conhecido que existem três formas de transferência espermática para a fêmea^{3,4}: a) *Cleistospermia*: cada espermatozoide é encapsulado individualmente, padrão encontrado na maioria das araneomorfas e compatível com um êmbolo estreito; b) *Cenospermia*: dois ou mais espermatozoides são encapsulados juntos, registrados para algumas aranhas primitivas; c) *Symspermia*: muitos espermatozoides são encapsulados em uma matriz comum formando uma estrutura grande. Os pacotes grandes se constituem de uma estratégia de proteção, contudo demanda um bulbo e êmbolo compatíveis, além da capacidade de geração de impulso suficiente para promoção do deslocamento dos espermatozoides^{4,5}. Segundo Costa-Ayub e Faraco⁶, a aranha-marrom se enquadra na symspermia cujo espermatozoides são encapsulados na forma sincicial compartilhando um citoplasma e membranas plasmáticas comuns.

O estudo da estratégia reprodutiva da aranha-marrom é importante pelo potencial de utilização no monitoramento e controle de infestações urbanas que ocorrem em milhares de acidentes anualmente, tal como presenciado em Curitiba⁷ onde coabitam duas espécies: *Loxosceles intermedia*, com 90% dos registros e *Loxosceles laeta* com 10%⁸. A prevalência de *L. intermedia* também em outros municípios paranaenses⁹ conduziu uma série de pesquisas sobre aspectos biológicos, ecológicos e comportamentais comparativamente com *L. laeta*¹⁰⁻¹⁶, apoiando um perfil mais errante e generalista para *L. intermedia* e

sedentário e agressivo para *L. laeta*. Esses padrões comportamentais refletiram em uma cópula com curto cortejo e cópula demorada em *L. intermedia* sendo apenas uma cópula suficiente para produzir até três ootecas férteis¹⁷ e longo cortejo e rápidas inserções em *L. laeta*, porém uma maior produção de filhotes¹⁰. Embora essas pesquisas elucidem o papel importante da maximização do curto intervalo de vida do macho ao fertilizar o maior número de fêmeas possível, até o presente momento não se conhece o efeito da interrupção da cópula na fertilidade das espécies. Partindo das diferenças do tempo de cópula e número de inserções, do curto tempo de sobrevivência do macho após a cópula e da transferência espermática por symspemia questiona-se se a interrupção da cópula é condicionante da fertilidade de *L. intermedia* e *L. laeta*. Considerando a superpopulação de *L. intermedia* em Curitiba, espera-se que apresentem uma estratégia que permita o macho, na sua curta existência, fertilizar um maior número de fêmeas. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito indireto da interrupção da cópula por meio da oviposição das fêmeas e direto pela análise morfológica do reservatório espermático do macho.

2. Metodologia

O presente estudo foi realizado no laboratório Núcleo de Estudos do Comportamento Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Grupo de Pesquisa Bioética Ambiental CNPQ/PUCPR, Programa de Pós-graduação em Bioética. As aranhas nasceram e foram criadas sob a mesma dieta e nas mesmas condições de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) e de umidade relativa do ar ($70 \pm 7\%$). As aranhas foram

mantidas individualizadas em recipientes plásticos de 120 ml e alimentadas semanalmente com larva de *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera), de *Gnathocerus cornutus* (Insecta: Coleoptera) ou ninfas de *Pcynocellus surinamensis* (Insecta; Blatariæ), todos criados em laboratório para essa finalidade.

Interrupção da cópula

Os experimentos consistiram de parrear aleatoriamente machos e fêmeas virgens de *L. intermedia* e *L. laeta* em três grupos de dez pares cuja cópula foi interrompida após três minutos e após 15 minutos em *L. intermedia* e após a primeira inserção e após a terceira inserção em *L. laeta*. Essa diferença se deu em decorrência da discrepância na duração da inserção em ambas as espécies (FV, F). Contudo em ambas, dez pares foram mantidos juntos até o final da cópula sem interrupção. Em todas as cópulas foram registrados: a) variáveis ambientais: temperatura e umidade relativa do ar; b) parâmetros físicos: tamanho e peso de fêmeas e machos, maior largura do bulbo e comprimento do estilete e área do reservatório espermático de ambos os pedipalpos; c) parâmetros copulatórios: duração do reconhecimento; cortejo e cópula e número de inserções; d) parâmetros reprodutivos: quantidade de ootecas, ovos, filhotes e fecundidade, acompanhados até oito meses após o experimento. Com intuito de inferir a influência dos experimentos em um contexto prático, foi realizado o pareamento de um macho com duas fêmeas sequencialmente, e igualmente realizadas dez repetições em ambas as espécies.

Análise do reservatório espermático masculino

A análise dos bulbos copulatórios teve com intuito avaliar a possibilidade de identificar por meio de análise morfológica em microscópio óptico o preenchimento do reservatório espermático. Assim, logo após a cópula, os machos foram anestesiados em acetato de etila, e seus pedipalpos preparados para análise em microscópio óptico. A preparação foi baseada em montagens realizadas para as aranhas *Pholcus phalangioides*¹⁸ e Theridiidae¹⁹. O método consiste na imersão das estruturas anatômicas em KOH (1g/ml) por um minuto com posterior imersão em água destilada também por um minuto. No entanto, o período descrito pelos autores não foi suficiente para a visualização da parte interna do bulbo. Para uma

adequação, foram testados outros períodos de exposição ao produto químico. Foram utilizados seis machos cujos pedipalpos foram submersos nos períodos de um, três, quatro, cinco e seis minutos em solução KOH 10%. O melhor resultado foi obtido a quatro minutos. Após a confecção das lâminas, estas foram visualizadas no microscópio óptico no aumento de 10x e foram estabelecidas as estruturas a serem mensuradas para análise quantitativa e comparativa. Após a visualização no microscópio, ficou instituído que seriam mensurados: a maior largura e o maior comprimento do reservatório; o tamanho total do êmbolo; e o tamanho total do bulbo de ambos os pedipalpos (FIGURA 1).

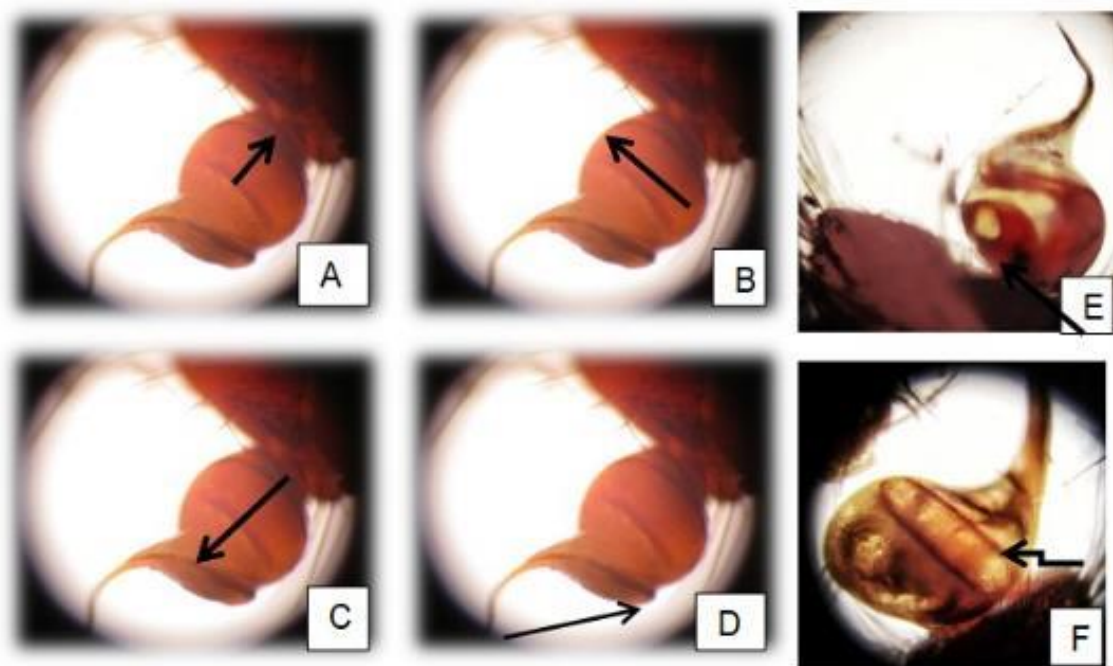


FIGURA 1 - Pedipalpo visto ao microscópio óptico aumento 10x. Setas indicando as estruturas mensuradas: A) Maior largura do reservatório. B) Maior comprimento do reservatório. C) Medida total do bulbo. D) Medida total do êmbolo. E) Bolha no bulbo copulatório de *L. intermedia* e F) Bolha no bulbo copulatório de *L. laeta*.

No caso da presença de bolhas, estas eram igualmente mensuradas na maior largura e comprimento, aferindo a área correspondente, para cálculo da proporção equivalente à área total do reservatório. Como grupo controle foram

analisados os pedipalpos de 10 machos virgens de cada espécie após três semanas de ter atingido a maturidade.

Procedimentos Estatísticos - As análises estatísticas foram realizadas comparativamente por meio dos testes

do qui-quadrado, testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Foi aplicado o teste de correlação de Person entre os parâmetros de fertilidade com os parâmetros físicos, copulatórios e experimentais (interrupção).

Procedimentos Legais - O presente estudo foi realizado segundo a legislação vigente no país, tendo o orientador autorização para coleta, captura e manutenção das aranhas emitido pelo IBAMA-PR (no. 10846-2) e o aval do Comitê de Ética em uso de animais CEUA-PUCPR (CEPA no. 68), e esse plano

de trabalho foi submetido para apreciação pelo mesmo comitê. A coleção de referência com três fêmeas e três machos será tombada na coleção científica do Museu de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob o número: 11721.

3. Resultados

Para *L. intermedia*, a interrupção precoce influenciou apenas no número de oviposições, contudo mantendo o número de ovos, filhotes e fecundidade (TABELA 1).

TABELA 1 - Parâmetros ambientais, físicos, copulatórios e reprodutivos em cópula monitoradas de *Loxosceles intermedia* submetidas a cópulas interrompidas após três e quinze minutos do início e cópulas ininterruptas (média ± desvio padrão (amostra; mínimo - máximo)).

VARIÁVEIS	CÓPULA <i>L. intermedia</i>			
	Média ± DV (N; mn.-max)			
	1ª interrupção	2a interrupção	Ininterrupto	
Ambientais Temperatura	25,6 ± 1,1 (10; 23,8 - 26,6)	22,5 ± 2,3 (10; 19 - 24,3)	22,9 ± 1,6 (10; 21,4 - 26,3)	
Umidade relativa do ar	60,6 ± 3,7 (10; 54 - 66)	57,5 ± 1,8 (10; 55 - 60)	56,2 ± 2,7 (10; 53 - 63)	
Físicas Tamanho do macho	6,4 ± 0,7 (10; 5 - 7,5)	6,8 ± 0,5 (10; 6 - 7,5)	6,1 ± 0,8 (10; 5 - 8)	
Tamanho da fêmea	4,7 ± 0,5 (10; 4 - 5)	5,1 ± 0,5 (10; 4 - 6)	5,5 ± 0,5 (10; 5 - 6)	
Peso do macho	61,7 ± 18 (10; 27 - 83,8)	63,85 ± 20,2 (10; 31,4 - 100,3)	50,2 ± 15 (10; 32 - 82)	
Peso da fêmea	121,1 ± 36,8 (10; 59 - 172)	106,8 ± 25,9 (10; 71 - 144)	128,5 ± 45,4 (10; 56 - 197)	
Bulbo direito	29,2 ± 5,6 (10; 22 - 40)	31,6 ± 7,5 (10; 20 - 45)	29,6 ± 4 (10; 20 - 35)	
Bulbo esquerdo	30,2 ± 3,9 (10; 32 - 42)	30,7 ± 35,7 (10; 21 - 41)	29,3 ± 4 (10; 22 - 35)	
Estilete direito	34,9 ± 4,5 (10; 30 - 40)	38,5 ± 5,2 (10; 30 - 45)	38,6 ± 8 (10; 30 - 60)	
Estilete esquerdo	36,5 ± 4,5 (10; 32 - 42)	36,7 ± 6 (10; 25 - 45)	38,2 ± 5,6 (10; 22 - 43)	
Área do reservatório direito	424,2 ± 128 (10; 160 - 578)	440 ± 78 (10; 250 - 560)	403 ± 81 (10; 240 - 512)	
Área do reservatório esquerdo	413 ± 3,9 (10; 300 - 592)	431 ± 155 (10; 250 - 540)	409 ± 105 (10; 242 - 608)	
Cópula Reconhecimento	52,5 ± 44,4 (10; 5 - 168)	69,1 ± 52,6 (10; 29 - 207)	68,1 ± 59,6 (10; 22 - 232)	
Cortejo	70,1 ± 90,7 (10; 6 - 320)	61,1 ± 85,7 (10; 12 - 313)	52,3 ± 43,9 (10; 6 - 165)	
Cópula	180 (10; 180)	900 (10; 900)	747,2 ± 760,1 (10; 52 - 2424)	
Nº inserções	1 (10; 1)	1 (10; 1)	1,9 ± 0,7 (10; 1 - 3)	
Oviposição ootecas	0,4 (4; 1)a	0,8 (10; 1-2)b	0,7 (8; 1-2)b	H=7,9; P<0,05
ovos	42 ± 13 (4; 29 - 62)a	41 ± 11 (8; 27-62)a	48,7 ± 26 (4; 26-91)a	H=1,7; P=0,4
filhotes	35,5 ± 18,5 (4; 17 - 54)a	29,3 ± 15 (8; 13-58)a	42,7 ± 30 (4; 8 - 90)a	H=3,3; P=0,18
Fecundidade	0,68 ± 0,17(4; 0,6-0,98)a	0,86 ± 0,2(4; 0-0,7)a	0,79 ± 0,2(4; 0,3-0,9)a	H=3; P=22

Os parâmetros reprodutivos foram comparados entre os experimentos por meio do testes não paramétricos Kruskal-Wallis e posteriori Mann-Whitney, sendo os valores significativamente diferentes (P<0,05) representados com letras distintas.

Já para *L. laeta*, a interrupção da cópula influenciou nos parâmetros reprodutivos, e quanto mais precoce a interrupção, menos ootecas foram depositadas. Contudo, o número de ovos depositados

e férteis foram condicionados apenas pela interrupção após a primeira inserção. Já a fecundidade, se manteve em todos os experimentos (TABELA 2).

TABELA 2 - Parâmetros ambientais, físicos, copulatórios e reprodutivos em cópula monitoradas de *Loxosceles laeta* submetidas a cópulas interrompidas após uma e três inserções do início e cópulas ininterruptas (média ± desvio padrão (amostra; mínimo - máximo). Os parâmetros reprodutivos foram comparados entre os experimentos por meio do teste não paramétricos Kruskal-Wallis e posteriori Mann-Whitney, sendo os valores significativamente diferentes (P<0,05) representados com letras distintas.

VARIÁVEIS		CÓPULA <i>L. laeta</i>			
		Média ± DV (N; min.-max)			
		1 INSERÇÃO	3 INSERÇÕES	Ininterrupto	
Ambientais	Temperatura	13,1 ± 1,15 (9; 21,3- 25,2)	22,7 ± 1,25 (9; 20,6- 24)	22,6 ± 0,79 (10; 20,5 - 23,4)	
	Umidade relativa do ar	47,9 ± 3 (9; 44 - 55)	49 ± 5,9 (9; 44- 60)	51,7 ± 6,6 (10; 44- 62)	
Físicas	Tamanho do macho	6,55 ± 1,01 (9; 4,5 - 8)	6,83 ± 0,33 (9; 6 - 7)	7 ± 0,7 (10; 5,5 - 8)	
	Tamanho da fêmea	5,22 ± 0,58 (9; 4,5 - 5,5)	5,44 ± 0,55 (9; 5 - 6,5)	5,55 ± 0,41 (10; 5 - 6)	
	Peso do macho	6,3 ± 27,3 (9; 28,7 - 114,4)	87,6 ± 11,99 (9; 70-108)	82,81 ± 19,19 (10; 41- 119)	
	Peso da fêmea	210 ± (9; 111 - 256)	214,1 ± 57,7 (9; 113 - 323)	223,7 ± 73,38 (10; 75 - 365)	
	Bulbo direito	34,1 ± 8 (10; 20 - 50)	35,4 ± 6 (10; 20 - 41)	35,7 ± 5,6 (10; 25 - 44)	
	Bulbo esquerdo	34,4 ± 7,5 (10; 25 - 50)	34,4 ± 7,5 (10; 25 - 50)	36,3 ± 5,4 (10; 26 - 46)	
	Estilete direito	73,3 ± 14,8 (10; 38 - 86)	73,3 ± 14,8 (10; 38 - 86)	73,9 ± 10,7 (10; 45 - 84)	
	Estilete esquerdo	75,6 ± 15 (10; 45 - 93)	75,6 ± 15 (10; 45 - 93)	74,8 ± 13 (10; 40 - 88)	
	Área do reservatório direito	528 ± 130 (10; 260 - 715)	528 ± 130 (10; 260 - 715)	556 ± 171 (10; 252 - 840)	
	Área do reservatório esquerdo	538 ± 122 (10; 273 - 756)	538 ± 122 (10; 273 - 756)	537,5 ± 175 (10; 280 - 750)	
Cópula	Reconhecimento	20,5 ± 18,7 (9; 5- 68)	88 ± 95,4 (9; 3- 234)	33,3 ± 28,1 (10; 4- 95)	
	Cortejo	54,8 ± 44,9 (9; 4 -130)	78,9 ± 84,1 (9; 4- 287)	78,8 ± 119,6 (10; 8- 427)	
	Cópula	3,4 ± 1,7 (9; 2 -7)	6,7 ± 3,12 (9; 3- 14)	14,5 ± 8,7 (10; 4- 33)	
	Nº inserções	1 (9; 1)	3 (9; 3)	5,7 ± 2,3 (10; 2- 10)	
Oviposição	ootecas	0,4 ± 0,4 (4; 0-1)a	0,8 ± 0,4 (10; 0-1)b	1,35 ± 0,4 (10; 1-2)c	H=5,9; P<0,05
	ovos	42 ± 27 (3; 18-80)a	77,5 ± 27 (8 38-140-80)b	69,9 ± 39 (8; 27-149)b	H=7,3; P<0,05
	filhotes	31,2 ± 0,4 (4; 0-79)a	70,2 ± 030 (8; 38-135)b	63,4 ± 39 (8; 27-143)b	H=6,9; P<0,05
	Fecundidade	0,7 ± 0,4 (4; 0-1)a	0,89 ± 0,1 (8; 0,5-1)a	0,91 ± 0,1 (8; 0,7-1)a	H=2,13; P<0,05

Os parâmetros reprodutivos foram comparados entre os experimentos por meio do teste não paramétricos Kruskal-Wallis e posteriori Mann-Whitney, sendo os valores significativamente diferentes (P<0,05) representados com letras distintas.

Parâmetros físicos e ambientais

Os parâmetros reprodutivos apresentaram correlação com poucos parâmetros físicos, e para *L. laeta*, o número de ootecas apresentou correção negativa com tamanho do macho no geral (R=-0,39) e na 2ª interrupção com peso do macho (R=0,69), e negativa com o tamanho do bulbo (R=-0,65). A quantidade de ovos apresentou correlação negativa com tamanho do bulbo (R=-0,71), de filhotes com comprimento do estilete (R=0,14) e fecundidade negativa com área do reservatório (R=-0,64). Para *L. intermedia*, a quantidade de ootecas apresentou

correlação com tamanho da fêmea (R=0,89) e área da bolha (R=0,5). A quantidade de ovos apresentou correlação com tamanho do macho (R=0,8) e peso do macho (R=0,76) e área da bolha (R=0,4) e fecundidade nas cópulas ininterruptas com a área do reservatório.

Análise dos pedipalpos

Os tamanho e formatos dos pedipalpos, bulbos copulatórios, receptáculos seminais e postura de cópula apresentam características dissonantes entre *L. intermedia* e *L. laeta* (FIGURA 2).

TABELA 3 - Comparação dos parâmetros reprodutivos de machos de *L. laeta* e *L. intermedia* pareados com duas fêmeas simultaneamente.

	Inserções	Ooteca	Ovos	Filhotes	Fecundidade
<i>L. intermedia</i>					
F1	1,8 ± 2,5 a (10; 1- 8)	0,8 ± 0,3 a (10; 0-1)	23,5 ± 19 a (8; 20-46)	20,7 ± 18a (8; 0-46)	0,7 ± 0,4 a (8; 0-1)
F2	3,8 ± 6a (10; 1- 18)	0,6 ± 0,5 a (10; 0- 1)	23,1 ± 28 a (8; 0-75)	17 ± 24 a (8; 0-59)	0,36 ± 0,37 a (8; 0-0,98)
<i>L. laeta</i>					
F1	1,8 ± 5,9 a (10; 3- 24)	0,6 ± 0,8 a (10; 0-2)	32,8 ± 49 a (10; 0-141)	32,2 ± 47 a (10; 0-135)	0,39 ± 0,5 a (10; 0-1)
F2	4,8 ± 3,8a (10; 1- 12)	0,6 ± 0,69 a (10; 0- 2)	37,4 ± 46 a (10; 0-130)	37,2 ± 45,7 a (10; 0-129)	0,49 ± 0,5 a (10; 0-1)

Os parâmetros reprodutivos foram comparados entre os experimentos por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis e posteriori Mann-Whitney, sendo os valores significativamente diferentes ($P < 0,05$) representados com letras distintas.

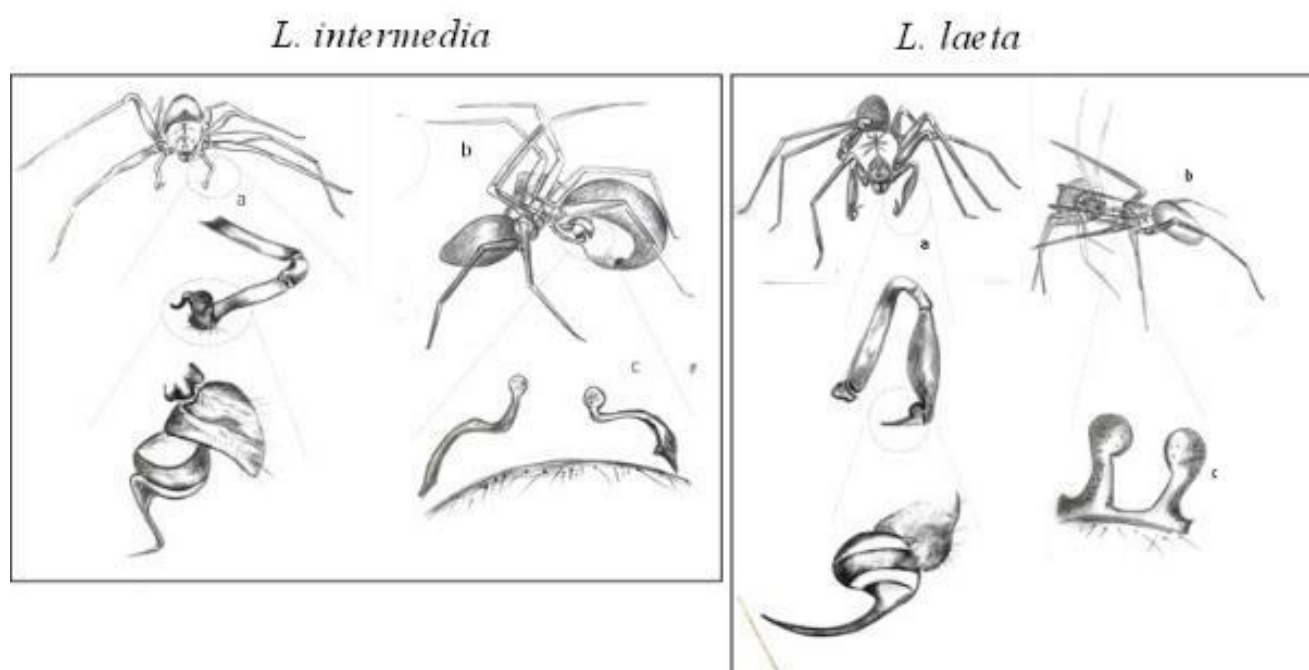


FIGURA 2 - Representação do a) macho com ampliação para formato do pedipalpo e ampliação para formato do bulbo copulatório e embolo; b) postura de cópula padrão; c) formato do receptáculo seminal de *L. intermedia* e *L. laeta*.

Enquanto *L. intermedia* apresenta embolos sinuosos e os ductos dos receptáculos seminais alongados com reservatórios globulosos e pequenos, *L. laeta* apresenta pedipalpos proporcionalmente maiores, embolos retos e receptáculos seminais largos e próximos. Os pedipalpos dos machos virgens não apresentaram bolhas, estando totalmente preenchidos. No entanto, na análise dos reservatórios dos

machos submetidos a diferentes tempos de interrupção de cópula foram observadas bolhas de ar. Entretanto não foram verificadas diferenças significativas entre os tempos de interrupção da cópula com relação à área correspondente à bolha ($F_{(32)}=0,51$; $P < 0,61$) nem tampouco quanto à proporção que estas representavam com relação à área total do reservatório espermático (TABELA 4)

A análise do número de bolhas conforme o padrão de interrupção da cópula resultou em maior número de bolhas,

conforme mais tempo de cópula (FIGURA 3).

TABELA 4 - Análise dos pedipalpos de machos de *L. intermedia* submetidos a diferentes padrões de interrupção de cópula, área média das bolhas (média ± desvio padrão (amostra; mínimo-máximo) e a proporção das mesmas com relação a área total.

Controle	Área da bolha		Proporção da bolha com relação ao reservatório	
	<i>L. laeta</i>	<i>L. intermedia</i>	<i>L. laeta</i>	<i>L. intermedia</i>
	Não tem	Não tem	Não tem	Não tem
1ª interrupção	0,07 ± 0,02 (4; 0,04- 0,11)	0,07 ± 0,03 (7; 0,03- 0,11)	0,26 (1)	0,29±0,04 (5; 0,18-0,05)
2ª interrupção	Não tem	0,06 ± 0,02 (10; 0,02 - 0,1)	Não tem	0,28±1,29 (9; 0-4,36)
Ininterrupto	0,03 ± 0,01 (3; 0,01 - 0,04)	0,06 ± 0,04 (15; 0,01 - 0,16)	0,22±2,1 (1; 0,8-1,2)	0,24±2,1 (8; 0,5-7,6)

As médias foram comparadas através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, não tendo os valores apresentado diferenças significativas (P<0,05).

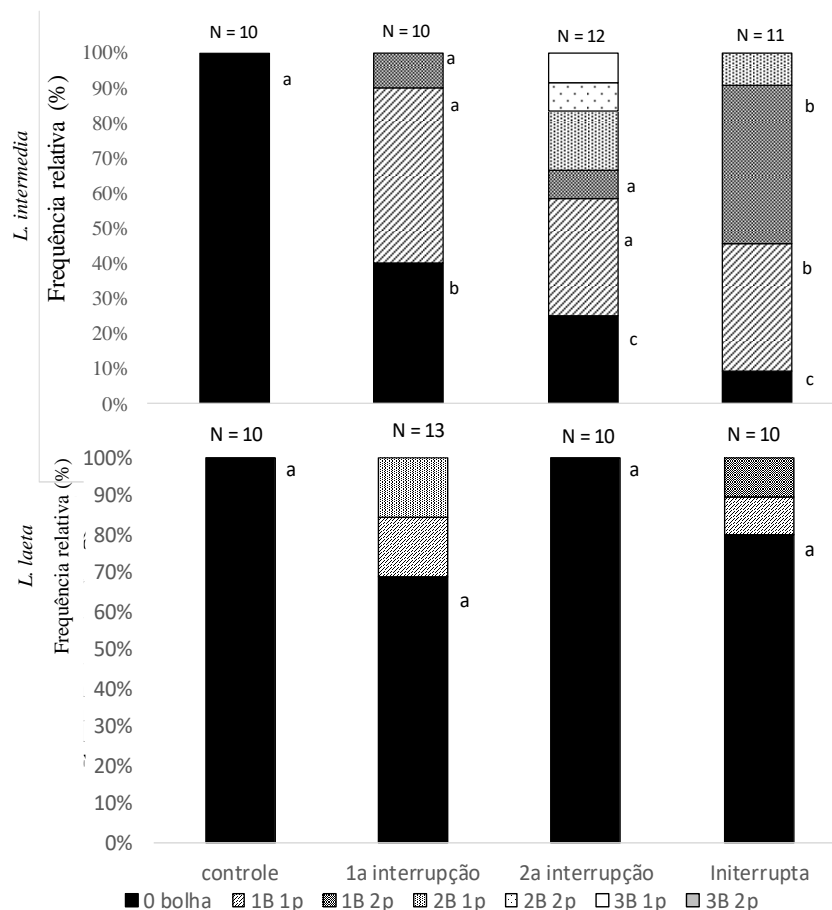


FIGURA 3 - Frequência relativa de bolhas em cada bulbo copulatório por tempo total de inserção sendo as abreviações: 0 bolha= pedipalpo sem bolha; 1B 1p= 1 pedipalpo com uma bolha; 1B 2p = dois pedipalpos com uma bolha em cada; 2B 1p (2 bolhas em 1 pedipalpo); 2B 2p= duas bolhas em ambos os pedipalpos; 3B 1p = três bolhas em um dos pedipalpos; 3B 2p= três bolhas em ambos os pedipalpos. Os valores absolutos foram comparados por meio do teste do qui-quadrado, sendo a comparação em cada tratamento os valores diferentes (P<0,05) significativamente estão acompanhado por letras distintas.

4. Discussão

A comparação dos efeitos da interrupção da cópula de *L. intermedia* e *L. laeta* corroboram outras pesquisas que apontaram para um hábito sedentário, territorial e agressivo de *L. laeta* contrapondo com um hábito generalista, errante e menos agressivo de *L. intermedia*^{8,9,11,16}. O comportamento reprodutivo de *L. laeta* foi correspondente com o relatado em literatura^{10,20}, caracterizado por um cortejo longo, em que o macho promove uma série de golpes na teia, provavelmente relacionado com o mecanismo de promoção de acinesia da fêmea, acrescido da utilização de seus longos pares de pernas anteriores para tocar e pressionar o cefalotórax da fêmea. Em movimentos rápidos, o macho puxa a fêmea, e introduz os êmbolos mantendo-os inseridos por poucos segundos, em séries sequenciais, que podem envolver a saída da posição de cópula, porém sem retirar as pernas anteriores do cefalotórax da fêmea. A acinesia da fêmea é breve e, normalmente, a separação é abrupta. Fêmeas que atingiram a maturidade recentemente e possuem poucas teias, são mais agressivas do que fêmeas velhas, que possuem densas teias¹⁰. Segundo Fischer^{10,11}, a concentração da teia pode estar relacionada com uma comunicação mais efetiva com o macho, padrão refletido, inclusive, nos encontros agonísticos entre machos que foram mais rápidos e mais distanciados. A análise da morfologia do aparelho reprodutor masculino e feminino subsidia essa hipótese. Os ductos que levam aos receptáculos seminais são largos e o reservatório amplo e com esclerotizada evidente apenas na região lateral externa, padrão que se mantém mesmo com variações intraespecíficas²¹. A pequena esclerotização dos receptáculos sugerem uma adesão menor com o estilete, que

precisa de uma flexibilidade para inserções rápidas, provavelmente relacionadas com a agressividade da fêmea. Essa morfologia se mostra compatível com uma inserção rápida, a qual igualmente encontra respaldo na forma do êmbolo com formato reto, acrescida da pressão decorrente da inserção instantânea. A correspondência entre o formato dos êmbolos e as inserções curtas e sequenciais de *L. laeta* são compatíveis com as informações de Michalik e Ramirez⁵ de que quanto maior o *synsperium* maiores devem ser o impulso do movimento e o êmbolo. A hipótese de que *L. laeta* possuía *synsperium* maiores do que *L. intermedia* são suportados tanto na maior fertilidade de *L. laeta*²² quanto na quantidade de oviposições e de ovos férteis serem equivalentes com três inserções quando comparados com a cópula interrompida. Uma vez que estas podem chegar a apresentar até 10 inserções com uma média de 5,7 inserções por cópula. Os dados suportam a hipótese de que de que uma inserção é suficiente para transferência espermática, contudo deve-se considerar que nem todas as inserções necessariamente envolvem a transferência espermática¹.

O comportamento reprodutivo de *L. intermedia* embora com um padrão reconhecível que envolve toque de pernas anteriores, vibração de pedipalpos e abdome, toque de pedipalpos em um cortejo rápido, a cópula pode apresentar longas durações de até 60 minutos, em que o casal permanece a maior parte do tempo imóvel e em postura de cópula^{12,15}. Fischer et al.¹⁵ caracterizaram a comunicação multimodal da espécie, que embora use, preferencialmente, componentes químicos cuticulares para reconhecimento, adicionalmente apresentam produção de som por meio da fricção de um pino presente na base

dos pedipalpos com uma ranhura presente na quelícera. Segundo os autores, a ocupação bem-sucedida do ambiente antrópico por *L. intermedia* pode estar relacionada com disponibilidade de diferentes substratos mais ou menos favoráveis à comunicação acústica, além de poder copular na presença ou ausência da teia. Fischer e Vasconcellos-Neto¹² registraram igualmente adequação da postura de cópula diante de tamanhos discrepantes de machos e fêmeas, impeditivos apenas quando diferenças não permitiam o alcance da abertura genital pelos machos. A análise do aparelho reprodutor feminino e masculino igualmente demonstram adesão à hipótese que associa o hábito de *L. intermedia* com a ampla distribuição dos ambientes antrópicos. Os ductos da genitália feminina são finos, sinuosos e alongados e localizados nas extremidades do sulco epigástrico²¹. Os reservatórios são globulares e pequenos comparativamente com *L. laeta*. Assim como os êmbolos do macho são curtos e igualmente sinuosos, o que sugere demandar de uma introdução mais sincronizada e precisa para encaixar no ducto alcançando a entrada do reservatório⁵. O formato de encaixe presume a funcionalidade de permanência da conexão, provavelmente protegendo a fêmea de novas cópulas, uma vez que, devido ao hábito errante e à ocorrência com elevadas populações, presume-se que os encontros sejam mais frequentes^{15,16}. Assim, provavelmente, o pequeno espaço do receptáculo seja inviável para mistura de uma quantidade elevada de *synsperium*, priorizando uso do material dos últimos machos que copularam. Os dados permitem inferir que os *synsperium* de *L. intermedia* sejam menores do que os de *L. laeta*, levando em consideração a fertilidade²², o formato do embolo, tamanho dos

receptáculos e o tempo da cópula. Consequentemente, devem ser liberados aos poucos, o que refletiria no fato da interrupção da cópula após 3 minutos já ter sido hábil em resultar em oviposições férteis e equivalentes às demais. Essa inferência é respaldada também devido à inseminação sequencial de machos ter mantido a mesma produção de ovos férteis e os valores serem correspondentes com outras pesquisas^{13,22} corroborando a perspectiva que podem inseminar muitas fêmeas conforme se deslocam pelo ambiente^{15,16}.

A avaliação dos bulbos copulatórios trazem um indicativo que pode ser uma via para desenvolvimento de inferências na estratégia reprodutiva, contudo, ainda demanda por desenvolvimento de técnicas mais apuradas e validação com estudos adicionais como preparação de lâminas histológicas. Entretanto, os dados iniciais apontam para uma possibilidade de adesão com a hipótese levantada na análise da morfologia da genitália e do efeito da interrupção da cópula nos parâmetros reprodutivos. A análise dos pedipalpos de *L. laeta* demonstraram menor formação de bolhas do que de *L. intermedia*, o que subsidia a existência de *synsperium* maiores e da exsudação destes em introduções breves, pois as bolhas foram visualizadas em alguns pedipalpos com interrupções após uma inserção e em algumas cópulas ininterruptas. Ressalta-se que as cópulas ininterruptas com presença de bolhas demoraram 8 e 5 segundos com oito e quatro inserções, respectivamente, contrapondo com a média desse experimento que foi de 14,5 segundos de cópula com 5,7 introduções. É possível que cópulas com inserções múltiplas nem sempre correspondam a introduções efetivas, mas a tentativas de encaixes²¹. Por outro lado, em *L. intermedia*, as bolhas foram mais

evidentes e frequentemente associadas com um tempo de interrupção da cópula corroborando a hipótese de que seus *synsperium* sejam menores e exsudatos aos poucos, mantendo ainda estoque para novas cópulas. Ressalva-se ainda o fato de a quantidade de ovos depositados apresentarem relação com a área da bolha. O esvaziamento assimétrico dos pedipalpos, acrescido de a área da bolha não ter diferido com o tempo de interrupção, encontram uma perspectiva de explicação na evidência de controle do macho na transferência. Dado este evidenciado quando comparado grupo controle que não apresentou nenhuma bolha e o grupo de término espontâneo em que predominou uma bolha em, pelo menos, um dos dois pedipalpos. Segundo Bukowski e Christenson¹, a liberação e armazenamento dos espermatozoides são processos independentes, e a cópula necessariamente não resulta na liberação, assim como nem todos os espermatozoides liberados são armazenados pela fêmea. Logo, o número de inserções e duração da cópula podem ser componentes da estratégia reprodutiva mais ou menos conservativa ou adaptativa. Huber²³ descreveu para aranhas haplóginas a existência de dois músculos bulbares relacionados com os movimentos rítmicos. Tradicionalmente, acreditava-se que o órgão copulatório masculino das aranhas, por ser derivado da unha tarsal, não possuía nenhum nervo, logo eram destituídos de sensibilidade e com funcionamento mecânico²⁴. Contudo Lipke et al.²⁴ localizaram nos pedipalpos simples da aranha de caverna *Hickmania troglodytes* (Gradungilidae) nervos relacionados com a geração de tensões e deformações potencialmente capazes de rapidamente modificar e modular as atividades secretoras influenciando nos processos de transferência espermática. Adicionalmente, caso o macho tenha

controle sobre a quantidade de espermatozoides transferidos para a fêmea, poderá modular as reservas de ambos os pedipalpos²⁵ e para espécies como *Latrodectus hasselti* há utilização prioritária do pedipalpo contendo uma maior quantidade de espermatozoides²⁵, enquanto *Nephila edulis* retira o pedipalpo do orifício genital da fêmea já fertilizada para inserir no lado ainda não inseminado²⁵. Fêmeas de aranhas primitivas como a aranha-marrom possuem um par de receptáculos, porém o macho pode preencher ambos com um único bulbo além da fêmea poder interromper a cópula com apenas uma espermoteca preenchida²⁵. Isso poderia explicar a simetria na presença das bolhas de ar.

Os resultados desta pesquisa se constituem de evidências que podem sustentar a hipótese do sucesso da estratégia reprodutiva de *L. intermedia* estar associada com a maximização do curto período de vida pelo macho¹³. De modo que, em um curto espaço de tempo, deveria fertilizar o maior número possível de fêmeas. Segundo Margraf et al.²⁶, a espermatogênese em *L. intermedia* é contínua durante a vida do macho, indicando a funcionalidade de cópulas simultâneas, e embora o processo de ovogênese inicie antes, o sincronismo na maturação subsidia a prioridade do último macho. Nos machos, o ducto possui um epitélio glandular compacto que parece controlar a passagem do *synsperium*, enquanto na ampola, a secreção microproteica reveste o *synsperium* habilitando-o para estocagem provendo nutrição, proteção e promovendo ativação no corpo da fêmea. Estudos preliminares^{27a30}, ainda não publicados, demonstraram que há diminuição da atividade espermiogênica de *L. intermedia* submetidos a estresse térmico decorrente de temperaturas

baixas ou altas, contudo que essa atividade pode ser totalmente recuperada com, aproximadamente, 30 dias em temperatura ambiente, sugerindo que essa reversibilidade seja um importante fator na adaptação e sucesso reprodutivo dessa espécie. Dado este que pode ser associado a uma maximização da curta vida do macho, uma vez que uma rápida recuperação da atividade espermiogênica e a presença de espermátides em diferentes graus de diferenciação permitiriam ao macho um constante preenchimento do bulbo copulatório e a fertilização de um maior número de fêmeas em um menor intervalo de tempo.

A espermateca da fêmea possui um papel mecânico e bioquímico no armazenamento dos pedipalpos. Ayub³¹ descreveu a ocorrência de tecidos glandulares que produzem secreções neutras mais concentradas em fêmeas jovens e virgens. Contudo, a cópula promove a mistura de secreções femininas e masculinas resultando em alterações proteicas que servem para reter os *synsperium* armazenados para eventos sucessivos, enquanto a camada lipoproteica evitaria a dissecação. Contudo Ayub³¹ não descartou a possibilidade de contribuírem para isolar os lotes e não misturar o material originário de machos distintos. Ayub³¹ identificou, ainda, espermatozoides livres, porém cercados de secreções semelhantes àquelas encontradas no útero, no útero externo, oviduto e ovário, mesmo em fêmeas que ovipositaram recentemente, sugerindo estarem se preparando para uma nova oviposição. Segundo Morishita et al.³², a oogenese também é contínua e a fertilização ocorre no translado do ovócito o qual recebe a membrana vitelínica e os grânulos que originarão o córion, essas camadas fazem a intermediação com os espermatozoides

quando ainda estão solúveis e provavelmente são responsáveis pela seleção dos espermatozoides da espécie.

5. Considerações Finais

Os dados obtidos, no recorte permitido pela amostragem e metodologias utilizadas nesta pesquisa, contribuem como evidências que sustentam a efetividade da estratégia reprodutiva de *L. intermedia* e seu sucesso na colonização de ambientes antrópicos quando comparado com *L. laeta*. As inferências subsidiadas pela análise da morfologia dos bulbos copulatórios e receptáculos seminais, efeitos da interrupção da cópula e verificação do preenchimento dos reservatórios demonstram a sinergia entre distintos condicionantes na fertilidade da fêmea. O efeito da interrupção da cópula nos parâmetros de fertilidade demonstraram que apenas poucos minutos de inserção para *L. intermedia* ou apenas uma inserção para *L. laeta* são suficientes para produção de ootecas férteis. Contudo a especulação da existência de *synsperium* maiores em *L. laeta* poderia incorrer em uma influência menor da fertilidade do que a evidenciada em *L. intermedia*. A análise da genitália também subsidiou essa hipótese, uma vez que, em *L. laeta*, os receptáculos largos e pouco esclerotizados estão aptos para receber os longos estiletos dos machos que precisam de flexibilidade para rápidas e intensas inserções adaptadas para liberação de um *synsperium* grande, bem como para se proteger da agressividade da fêmea que apresenta uma acinesia breve. Já *L. intermedia* apresenta ductos da genitália feminina longos, sinuosos, finos e esclerotizados o que remete a um encaixe mais preciso do êmbolo do macho. Logo, demandando movimentos mais sutis e que sugerem uma adesão

maior do casal, prevenindo que a fêmea copule com outros machos, pelo menos até o *synsperium* ser revestido pelas secreções dos receptáculos.

A análise dos reservatórios dos bulbos copulatórios igualmente subsidiam as hipóteses levantadas, uma vez que foram mais evidentes para *L. intermedia* e mais frequentes quanto maior o tempo de cópula e correlacionados com o número de ovos. O *synsperium* menor de *L. intermedia* e o uso assimétrico embasam a maior locomoção e hábito generalista atribuído à espécie, cujo sucesso na colonização do ambiente antrópico está na possibilidade de realizar cópulas sucessivas sem a necessidade de repor o *synsperium* no reservatório. As inferências levantadas permitem os estabelecimentos de pistas teóricas na interpretação dos condicionantes do sucesso reprodutivo de *L. intermedia* e *L. laeta*, sugerindo fortemente, que estudos mais amplos, envolvendo outras espécies de aranha-marrom, especialmente aquelas com distribuição mais ampla e maior interesse médico como *L. amazonica* e *L. gaucho* sejam incluídas nas análises.

Os dados do presente estudo contribuem para o conhecimento a respeito das estratégias reprodutivas de *L. intermedia* comparativamente com *L. laeta* subsidia trilhas interpretativas do sucesso na colonização dos ambientes antrópicos.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem às graduandas de biologia Naila Cristina Ribeiro Caetano, Bruna Lemos e Acir José Franco pelo apoio na manutenção das criações e ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, em especial, ao Msc Emaunel Marques da Silva pelo apoio à

pesquisa com o suprimento de aranhas e ao apoio Institucional ao Programa de Iniciação Científica da PUCPR.

7. Referências

1. BUKOWSKI, T.C.; CHRISTENSON, T.E. Determinants of sperm release and storage in a spiny orbweaving spider. *Animal Behaviour*. v.53, n.2, p.381-95, 1997
2. ELGAR, M.A.; BIRKHEAD, T.R. Sperm competition and sexual selection in spiders. *Sperm competition and sexual selection*, v. 12, p. 307-39, 1998.
3. FOELIX, R. F. *Biology of Spiders*. Cambridge, Harvard University Press, 2nd ed., 330p., 1996.
4. HERBERSTEIN, M.E.; SCHNEIDER, J.M.; UHL, G; MICHALIK, P. Sperm dynamics in spiders. *Behavioral Ecology*. v.22, n.4, p. 692-5, 2011.
5. MICHALIK, P.; RAMÍREZ, M.J. Evolutionary morphology of the male reproductive system, spermatozoa and seminal fluid of spiders (Araneae, Arachnida)– Current knowledge and future directions. *Arthropod Structure & Development*, v.43, n.4, p. 291-322, 2014.
6. COSTA-AYUB, C.L.; FARACO, C.D. Ultrastructural aspects of spermiogenesis and synspermia in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). *Arthropod Structure & Development*. V.36, n.1, p.41-51, 2007.
7. MARQUES-DA-SILVA, E.; SANTOS, R. S.; FISCHER, M. L; RÚBIO, G. *Loxosceles* spider bites in the State of Paraná, Brazil: 1993-2000

- (Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. V.12, p.110-23, 2006.
8. FISCHER, M. L.; VASCONCELOS-NETO; J. Microhabitats Occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. Journal of Medical Entomology, v. 42, p. 756-765, 2005a.
 9. MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, p. 331-335, 2005.
 10. FISCHER, M. L. Comportamento sexual de *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae, Sicariidae): influência da idade da fêmea. Revista Brasileira de Zoologia, v.24, n.4, p.865-872, 2007.
 11. FISCHER, M. L. Comportamento agonístico de *Loxosceles laeta*, *L. hirsuta* e *L. laeta* (Aranea: Sicariidae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 25, n.4, p. 579-586, 2008.
 12. FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Comportamento sexual de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Aranae; Sicariidae). Revista de Etologia, v. 2, p. 31-42, 2000.
 13. FISCHER, M. L.; VASCONCELOS-NETO; J. The fecundity of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae; Sicariidae). Journal of Arachnology, v. 33: 670-680, 2005b.
 14. FISCHER, M. L.; PAROLIN, L. C.; NEVES, F. M.; VILLANUEVA-BONILLA, G. A.; VASCONCELLOS-NETO, J. Effects of food, kinship, and density on the longevity of spiderlings. Canadian Journal of Zoology, v. 99, n.9, p. 741-751, 2021.
 15. FISCHER, M.L. et al. Sound is involved in multimodal communication of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934 (Araneae; Sicariidae). Behavioural processes. v 82, n.3, p.236-43, 2009.
 16. FISCHER, M.L.; DINIZ, S. VASCONCELLOS-NETO', J. Do agonistic interactions underlie the segregation and relative abundances between two *Loxosceles* species (Araneae: Sicariidae)?. Journal of medical Entomology. V.1, 3, p.547-59, 2014.
 17. FISCHER, M. L.; VASCONCELOS-Neto; J. Development and life tables of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitao 1934 (Araneae, Sicariidae). The Journal of Arachnology, v.33, n.3, p.758-66, 2005c
 18. MICHALIK, P.; UHL, G. The male genital system of the cellar spider *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholcidae, Araneae): development of spermatozoa and seminal secretion. Frontiers in Zoology, v.2, p.12, 2005.
 19. AGNARSSON, I.; CODDINGTON, J. A.; KNOFLACH, B. Morphology and Evolution of Cobweb Spider Male Genitalia (Araneae, Theridiidae). The Journal of Arachnology, v. 35, p. 334–395, 2007.
 20. GALIANO, M. E. Ciclo biológico y desarrollo de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849). Acta Zoologica Liloana, v.23, p. 431-464, 1967.

21. FISCHER, M. L. Levantamento das espécies do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. *Estudos de Biologia*, v. 38, p. 63-88, 1994.
22. GONÇALVES-De-ANDRADE, R. M.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae). *The Journal of Arachnology* v. 28, p. 245–247, 2000.
23. HUBER, B.A. Evolutionary transformation from muscular to hydraulic movements in spider (Arachnida, Araneae) genitalia: a study based on histological serial sections. *Journal of Morphology*, v.261, n.3, p. 364-76, 2004.
24. LIPKE, E.; HAMMEL, J.U.; MICHALIK, P.. First evidence of neurons in the male copulatory organ of a spider (Arachnida, Araneae). *Biology Letters*, v.11, n.7, p.20150465, 2015.
25. EBERHARD, W.G.; HUBER, B.A. Spider genitalia: precise maneuvers with a numb structure in a complex lock. Pp. 249-284. In: J. L. Leonard & A. Córdoba-Aguilar (eds.) *Evolution of primary sexual characters in animals*. Oxford University Press, Oxford, U.K.
26. MARGRAF, A.; COSTA-AYUB, C.L.; OKADA, M.A.; GOMES, J.R. Ortolani-Machado CF, Soares MA. Development of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitao (1934)(Araneae, Sicariidae) genital tract. *Brazilian Journal of Biology*, v.71, p. 747-54, 2011.
27. PEDRON, F. R.; COSTA-AYUB, C. L. S.; MARGRAF, A.; SOARES, M. A. M. Avaliação Morfológica do Aparato Reprodutor Masculino da Aranha Marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae: Sicariidae) Mantida a Temperatura Baixa. *Anais do XIX EAIC – 28 a 30 de outubro de 2010, UNICENTRO, Guarapuava –PR, 2010*
28. ALTHAUS, H. V.; MARGRAF, A.; COSTA-AYUB, C. L. S.; SOARES, M. A. M. Influência da Temperatura na Atividade do Aparelho Reprodutor Masculino de Adultos da Aranha Marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (Araneae: Sicariidae). *Anais do XX EAIC – 20 a 22 de outubro de 2011, UEPG, Ponta Grossa–PR, 2011.*
29. ALTHAUS, H. V.; SOARES, M. A. M.; GOMES, J. R.; COSTA-AYUB, C. L. S. Influência da Temperatura na Atividade do Aparelho Reprodutor Masculino de Adultos da Aranha Marrom *Loxosceles intermedia* Mello Leitão (1934) (Araneae: Sicariidae) Após Copula. *Anais do 21º EAIC/ 2º EAITI – 9 a 11 de outMARINGÁ – PR, 2012.*
30. ALBUQUERQUE, S. A. F.; MARGRAF, A.; SOARES, M. A. M.; GOMES, J. R.; COSTA-AYUB, C. L. S. Avaliação Morfológica dos Testículos de *Loxosceles intermedia* (Araneae, Sicariidae) em Estresse Térmico 30 dias a 11°C. **Anais do XIX EAIC – 28 a 30 de outubro de 2010, UNICENTRO, Guarapuava –PR, 2010.**
31. AYUB, C.L. Estudo da espermatogênese e da morfologia dos espermatozoides da Aranha Marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934)(Araneae: Sicariidae), antes e após a transferência para o corpo da fêmea (Dissertação de doutorado).2006

32. MORISHITA R, A.; FERREIRA S.; SANTIAGO-FILHO A.; DITZEL, F.C. Studies on oogenesis and oviposition in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists, vol. 273, n.1, p. 575-82, 2003