

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

EDIMARA SALETE DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DO GÂNGLIO NERVOSO
DE *Loxosceles* (Aracnida: Araneae)**

DOIS VIZINHOS

2022

EDIMARA SALETE DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DO GÂNGLIO NERVOSO
DE *Loxosceles* (Aracnida: Araneae)**

**Comparative analysis on morphological and histochemical characterization of
nervous ganglions of *Loxosceles* (Arachnida: Araneae)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Licenciado em Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Franchi de Freitas.

DOIS VIZINHOS

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

EDIMARA SALETE DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DO GÂNGLIO NERVOSO
DE *Loxosceles* (Arachnida: Araneae)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Licenciado em Ciências Biológicas da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 29/novembro/2022

Thiago Cacção Villa
Biólogo e Mestre
UTFPR - Dois Vizinhos

Maria Antônia Michels de Souza
Bióloga e Doutora.
UTFPR - Dois Vizinhos

Patricia Franchi de Freitas
Profa. Dra. Bióloga.
UTFPR - Dois Vizinhos

DOIS VIZINHOS

2022

Dedico este trabalho à minha família, pelos momentos de ausência, aos professores pelo apoio e por todos que já conheci. Sem todos, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer este trabalho primeiramente à minha mãe e pai, por todo apoio e dedicação que tiveram para que eu pudesse um dia estar apresentando meu TCC, à minha orientadora Dr. Prof^a Patrícia por todos os ensinamentos e confiança ao longo de todos os anos, independente do horário ou dia da semana, estava sempre presente para sanar minhas dúvidas, aos professores da UTFPR, com uma grande ênfase nas professoras Nedia Ghisi e Jucelaine Hass que me apoiaram quando eu mesma não tinha confiança e pelo meu amado noivo Gilberto, que esteve presente ao longo do TCC e que estará presente ao longo toda a vida. Também agradeço a todos que passaram pela minha vida e que se não fossem os ensinamentos que obtive em sua breve passagem pela minha vida, não estaria onde estou atualmente.

“Normal é uma ilusão. O que é normal para uma aranha, é caos para a mosca.”

Morticia Addams.

RESUMO

As aranhas *Loxosceles*, na saúde pública, representam um risco à população por serem as responsáveis por milhares de acidentes por ano no Brasil, onde a concentração do número de casos envolvendo esse gênero é no Paraná. Por terem um tamanho reduzido, coloração semelhante ao ambiente que vivem ou coloração escura e terem hábitos noturnos, não se nota a presença imediata dessas aranhas, como também dificulta seu estudo. Sua picada muitas vezes não é percebida de imediato, tem ação necrosante e em casos mais graves pode ocasionar anemia e insuficiência renal aguda, levando o paciente a óbito. Devido a sua importância, se faz necessário um estudo morfológico e histoquímico desses organismos para aprofundar os métodos de profilaxia e prevenção de acidentes para a população. O objetivo deste trabalho é testar dois métodos de inclusão e dois métodos de coloração para observar qual método de inclusão é melhor na preservação do material e qual método de coloração irá evidenciar satisfatoriamente o tecido do gânglio nervoso de aranhas *Loxosceles*. Para a realização desse trabalho, 20 espécimes foram coletados na cidade de Dois Vizinhos- PR, levados para a UTFPR-Dois Vizinhos e anestesiados para terem seu cefalotórax perfurado (para melhor penetração dos reagentes), então foram submetidos à eutanásia. Após, fixados em Carnoy por três dias, e separados em grupos: 1-Inclusão em Parafina com cera de abelha e coloração de Hematoxilina e Eosina, 2-Inclusão em Parafina com cera de abelha e histoquímica de PAS, 3-Inclusão em Historesina e coloração de Hematoxilina e Eosina e 4-Inclusão em Historesina e histoquímica de PAS. Após a montagem total das lâminas, foi feito o registro fotográfico e durante a análise da preservação das amostras em microscópio de luz, os cortes dos diferentes grupos foram comparados entre si para determinar quais dos grupos apresentam a melhor preservação da organização morfológica, se a penetração do fixador foi concluída com sucesso, se a inclusão com parafina ou Historesina se deu de forma correta e qual coloração foi melhor para destacar a estrutura alvo. Conclui-se, com este trabalho, que a inclusão em parafina e a coloração PAS foram mais efetivas para o destaque do gânglio nervoso, preservando e evidenciando melhor a estrutura alvo.

Palavras-chave: Neural. Morfologia. Loxosceles. Aranha.

ABSTRACT

Spiders of the genus *Loxosceles*, in public health, represent a risk to the population in general, as they are responsible for thousands of accidents per year in Brazil, where the concentration of cases involving this genus is in Paraná. Because they have a small size, color similar to the environment they live in or dark color and have nocturnal habits, it is not immediately observed the presence of these spiders, as well as complicates its study. Their bite is not often immediately noticed, it has a necrotizing action and in severe cases it can cause anemia and acute renal failure, leading to the patient's death. Due its importance, a morphological and histochemical study of these organisms to deepen the methods of prophylaxis and accident prevention for the population. The objective of this paper is to test two inclusion and coloring methods to observe which inclusion method is the best in the preservation of the material and which staining method will satisfactorily evidence the nerve ganglion tissue of spiders of the genus *Loxosceles*. To carry out this work, 20 specimens were collected in the city of Dois Vizinhos-PR, taken to the UTFPR-Dois Vizinhos and anesthetized to have their cephalothorax perforated (for better penetration of the reagents) and then euthanized. They were fixed in Carnoy for three days, and separated into groups: 1-Inclusion in Paraffin with beeswax and staining with Hematoxylin and Eosin, 2-Inclusion in Paraffin with beeswax and PAS histochemistry, 3-Inclusion in Historesin and staining of Hematoxylin and Eosin and 4-Inclusion in Historesin and PAS histochemistry. After the slides were fully assembled, the photographic record was made and the preservation of the slides was analyzed under a light microscope and during the analysis, the sections of the different groups were compared to each other to determine which of the groups presented the best morphation of the organization. faith fixative successfully completed, if the embedding with paraffin or Historesin was correct and which faith coloring best to highlight the target structure. It is concluded, with this work, that the inclusion in paraffin and the PAS staining were more effective for highlighting the nervous ganglion, preserving and better showing the target structure.

Keywords: Neural. Morphology. *Loxosceles*. Spider.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema da morfologia interna de uma aranha. 15
- Figura 2– Comparação de tamanho entre uma moeda e uma *Loxosceles intermedia*. 16
- Figura 3–Diferentes espécies de *Loxosceles* que causam os acidentes no Brasil. 17
- Figura 4–Mapa de distribuição dos acidentes por aranhas – 2020. 18
- Figura 5–Fotos de lesões causadas pelo veneno da picada de *Loxosceles*. 19
- Figura 6 – Ilustração de como é feito o processamento/incrustação de um tecido em parafina. 20
- Figura 7 – Aranhas capturadas para a histologia. 23
- Figura 8 – Micrótomo com o bloco de parafina para cortes. 25
- Figura 9 – Cortes histológicos longitudinais de *Loxosceles*, incluída em parafina e cera de abelha (prop 3:1), corados Hematoxilina e Eosina (A), e marcados histoquimicamente com PAS (B, C e D), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto.Fonte: autoria própria, 2022. 32
- Figura 10 – Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em Histoiresina, marcados histoquimicamente com PAS (imagens A, B, C, D e E), em microscópio de luz. GV: Glândula de veneno, GC: Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto.Fonte: autoria própria, 2022. 34
- Figura 11 – Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em parafina e cera de abelha, prop 3:1 (A, B e D) e Histoiresina (C), corados Hematoxilina e Eosina (A, B e D), e marcados histoquimicamente com PAS (C), em

microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto. Fonte: autoria própria, 2022. 36

Figura 12 – Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em parafina e cera de abelha (prop 3:1), corados Hematoxilina e Eosina (A), e marcados histoquimicamente com PAS (B, C e D), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago, M:Músculo, OL: Olho composto e EX: Exoesqueleto. Fonte: autoria própria, 2022. 38

Figura 13 –Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em parafina e cera de abelha (prop 3:1), corados Hematoxilina e Eosina (imagem A), e marcados histoquimicamente com PAS (imagens B, C e D), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto. Fonte: autoria própria, 2022. 39

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivos específicos.....	14
3. Referencial teórico.....	15
4. Justificativa.....	22
5. Metodologia.....	23
5.1. Inclusão em Parafina e cera de abelha.....	24
5.2. Inclusão em Histoiresina.....	24
5.3. Microtomia.....	25
5.4. Preparo do material em parafina com cera de abelha para colorações..	25
5.5. Preparo do material em histoiresina para as colorações.....	26
5.6. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).....	26
5.7. Histoquímica pelo método de PAS.....	27
5.8. Coloração pelo método PAS.....	27
5.9. Análise e registro fotográfico.....	28
6. Resultados e Discussão.....	30
6.1. Análise morfológica dos métodos de inclusão.....	31
6.1.1. Inclusão em parafina e cera de abelha 3:1.....	31
6.1.2. Inclusão em Histoiresina.....	33
6.2. Análise morfológica dos métodos de coloração.....	35
6.2.1. HE.....	35
6.2.2. PAS.....	37
7. Conclusões finais	40
8. Referências.....	41

1 INTRODUÇÃO

Um dos grupos importantes do filo Arthropoda corresponde ao Subfilo Chelicerata, no qual se encontra a Classe Arachnida (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Compreende a Ordem Araneae, que contém aproximadamente 46.000 espécies divididas em 110 famílias e 3.750 gêneros (PLATNICK, 2019). Segundo o Ministério da Saúde, apenas *Phoneutria*, *Lycosa* e *Loxosceles* (aranha armadeira, viúva negra e aranha marrom, respectivamente). são a causa de casos graves recorrentes na saúde pública.

Entre esses gêneros estão as aranhas conhecidas popularmente como "aranhas marrons" ou "aranhas violino" (*Loxosceles*), apresentam o corpo de cor marrom, marrom-amarelada ou marrom escuro tamanho de 1,0 a 4,0 cm e possuem três pares de olhos. Vivem em intradomicílio, ou encontram-se em pilhas de tijolos, telhas e beiras de barrancos. São pouco agressivas e possuem hábitos noturnos, mas podem ser achadas em locais escuros, como roupas, calçados e atrás de móveis (Ministério da Saúde, 2019). (exceto *Loxosceles laeta* – agressiva e mais letal)

Acidentes com *Loxosceles* são considerados problemas na saúde pública, pois, seu veneno atua sobre o endotélio vascular e hemácias, desencadeando um intenso processo inflamatório, obstrução dos pequenos vasos, edema, hemorragia e necrose focal. Em casos mais graves pode levar a anemia e insuficiência renal aguda, principal causa de óbitos decorrentes de acidentes (Ministério da Saúde, 2019).

A forma de estudo abordada para auxiliar e aumentar os conhecimentos sobre as aranhas do gênero *Loxosceles* será histologia, que é o estudo da morfologia e organização das células e tecidos. Os organismos vivos multicelulares são constituídos por quatro tipos básicos de tecidos: epitelial, nervoso, conjuntivo e muscular (JUNQUEIRA, 2008). Os estudos realizados em nível tecidual ocorre de cortes muito finos na escala de micrômetros visualizados em microscopia óptica que permite a identificação da forma e organização dos tecidos.

Para esses estudos são feitos cortes de espessura entre 6 e 8 µm (micrômetros) visualizados em microscópio óptico, que permite a identificação da

forma e da organização dos tecidos. Os cortes são preparados a partir de uma série de procedimentos para preservação e realce das estruturas alvo.

Esse trabalho se propôs a testar dois métodos de inclusão e dois métodos de coloração no tecido do gânglio nervoso de *Loxosceles*, que poderá auxiliar outros pesquisadores a aprofundar o conhecimento na biologia dessas aranhas. Dado o fato que as aranhas marrons causam problemas na saúde pública, ter mais conhecimento sobre esse gênero de aranhas pode auxiliar em estudos futuros no controle e profilaxia, a fim de se reduzir os casos, e contribuir para a melhor compreensão das espécies do gênero *Loxosceles*.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo testar dois métodos de inclusão e dois métodos de coloração (um deles histoquímico) para o estudo morfológico do gânglio nervoso, localizado no sistema nervoso central de *Loxosceles*.

2.1 Objetivos específicos:

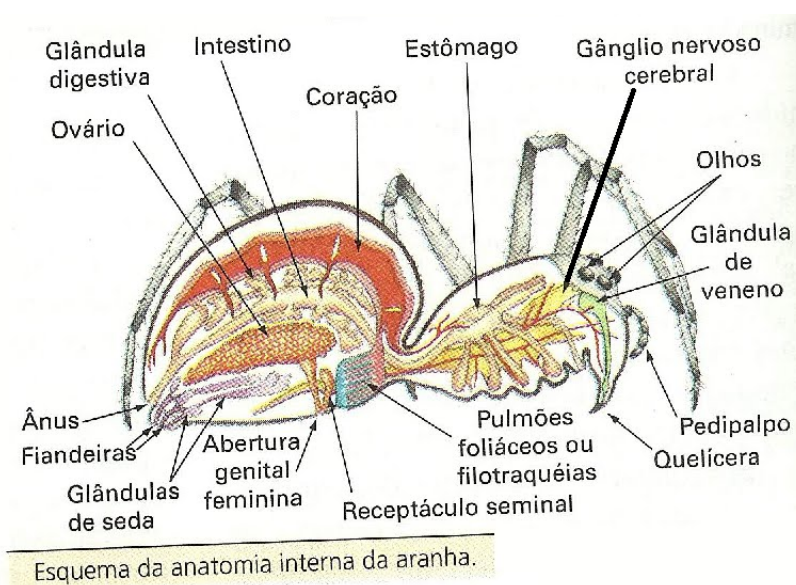
- Comparar a preservação tecidual do sistema nervoso (gânglio nervoso) de *Loxosceles*, utilizando dois métodos de inclusão: parafina e cera de abelha, e Histoiresina.
- Comparar dois métodos quanto a melhor visualização, em microscópio de luz, do gânglio nervoso do sistema nervoso central de *Loxosceles*: Hematoxilina e Eosina (HE), e a coloração de PAS ou reação de Ácido periódico de Schiff (PAS).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Arthropoda forma o filo com os mais diversos e abundantes seres da Terra, incluindo os de importância médica, econômica e ambiental. Dominaram todos os ambientes, e possuem as mais diversas morfologias e cores; são predadores, detritívoros, herbívoros, parasitas ou decompositores, ocupando diversos nichos ecológicos (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Comumente e com certa familiaridade com o ser humano estão as aranhas, escorpiões, insetos e caranguejos e uma vasta gama de animais segmentados que apresentam exoesqueleto e apêndices articulados (RUPPERT, 2005). Surgiram provavelmente há 600 milhões de anos nos mares antigos do pré-cambriano, sendo 85% de todas as espécies de animais descritos (BRUSCA; BRUSCA, 2007), e ainda existe uma gama enorme deles que permanecem sem serem descobertas pelo homem, muitas vezes pela dificuldade de locomoção para esses locais, a falta de especialistas interessados e incentivos para esse tipo de pesquisa.

Um dos grupos importantes do filo Arthropoda corresponde ao Subfilo Chelicerata, no qual se encontra a Classe Arachnida (BRUSCA; BRUSCA, 2007), que compreende a Ordem Araneae, que contém aproximadamente 46.000 espécies, divididas em 110 famílias e 3.750 gêneros (PLATNICK, 2019).

Figura 1 -Esquema da morfologia interna de uma aranha.



As aranhas são animais predadores, e para isso possuem um par de glândulas produtoras de veneno que é lançado pelas quelíceras (figura 1), por um canal que as atravessa para inocular no alvo escolhido. As quelíceras têm um formato pontiagudo e são responsáveis pela inoculação do veneno nas vítimas. Além disso, estas estruturas também são utilizadas para macerar a presa e facilitar sua ingestão (BARNES, 1990).

No Estado do Paraná, há cinco gêneros de aranhas que causam problemas na saúde pública, segundo o Ministério da Saúde: *Loxosceles*, *Phoneutria*, *Lycosa*, *Mygalomorphae* e *Latrodectus*, conhecidas popularmente como: Aranha marrom, aranha armadeira, aranha de jardim, aranha caranguejeira e viúva negra. Destas, apenas três apresentam casos graves e recorrentes, sendo a Aranha armadeira (*Phoneutria*), aranha de jardim (*Lycosa*) e a aranha marrom (*Loxosceles*). As popularmente como "aranhas marrons" ou "aranhas violino", apresentam o corpo de cor marrom, marrom-amarelada ou marrom escuro, e não variando de tamanho de 1,0 a 4,0 cm, como demonstra a Figura 2, e possuem três pares de olhos (FISCHER, 2005).

Figura 2-Comparação de tamanho entre uma moeda e uma *Loxosceles intermedia*.



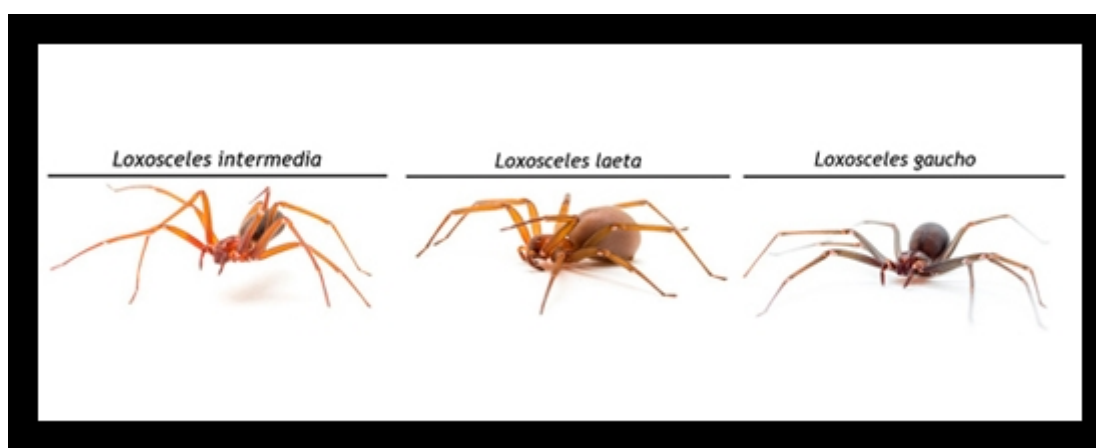
Fonte: <https://www.educamaisbrasil.com.br/enem/biologia/aranha-marrom>

As representantes do gênero *Loxosceles* no Paraná ocorrem com maior frequência em Curitiba, região Metropolitana, região de Irati, Ponta Grossa, Guarapuava, União da Vitória, Pato Branco e Jacarezinho do que no resto do Estado

(figura 4) , porém esse gênero pode ocorrer em todo o mundo. Segundo a Secretária de Saúde do Paraná: não são aranhas agressivas, gostam de lugares escuros quentes e secos. No ambiente externo vivem em cascas de árvores soltas ou buracos. Em meios urbanos vivem em telhas e tijolos empilhados, mas podem viver dentro das casas em locais que não são muito remexidos, como: atrás de quadros, estantes com livros, caixas de papelão, etc.

No Brasil, encontram-se oito espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*, das quais, quatro são endêmicas do país: *L. smilis*, *L. amazonica* e *L. puerto*, e quatro de países adjacentes: *L. laeta*, *L. intermedia*, *L. hisuruta* e *L. adalaida*. Estas três espécies, representadas na figura 3, são as principais de interesse médico, devido ao grande número de acidentes no país: *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Ministério da saúde, 2019; DA SLVA, 2004; PLATINICK, 2019).

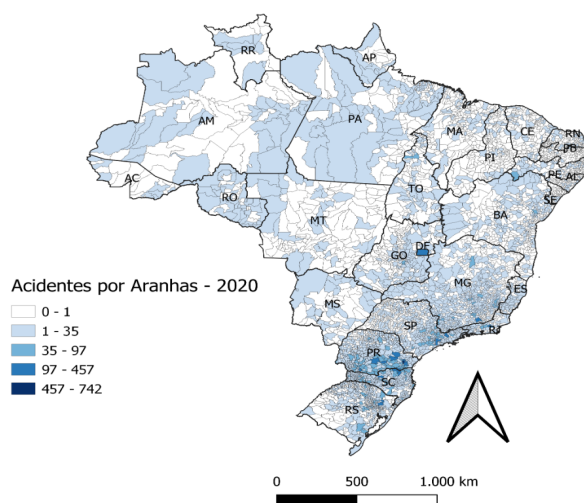
Figura 3 -Diferentes espécies de *Loxosceles* que causam os acidentes no Brasil.



Fonte: <http://agencia.fapesp.br/pomada-contra-efeitos-da-picada-da-aranha-marrom-e-testada-em-humanos/29274/>

Os acidentes envolvendo as aranhas *Loxosceles* atingem mais adultos, que costumam ser picados nas coxas, tronco ou braço. O quadro clínico inicial da picada é imperceptível devido ao tamanho reduzido da aranha, mas após 24 horas pode se apresentar sob duas formas: a primeira forma é a cutânea, se apresenta na grande maioria dos casos, semelhante ao caso mostrado na figura 3, com índice de 87% a 98% aproximadamente. Tem instalação lenta e progressiva, com sintomas como: dor, edema endurecido e eritema no local da picada.

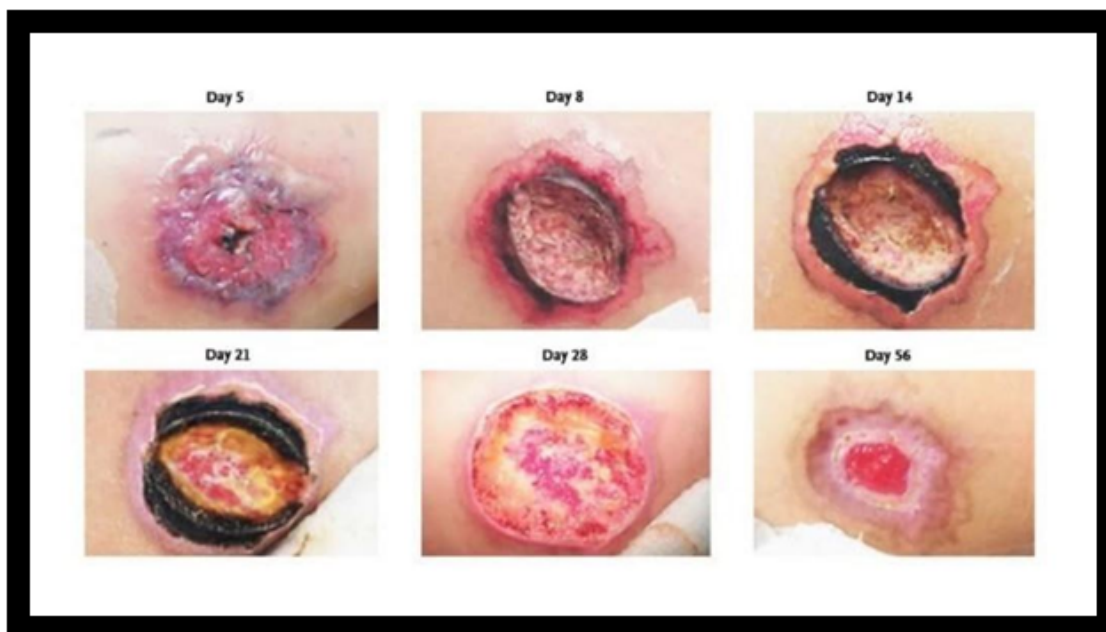
Figura 4 -Mapa de distribuição dos acidentes por aranhas – 2020.



Fonte: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/acidentes-ofidicos/acidentes-por-aranhas>

Após as primeiras 24 a 72 horas, segundo a cartilha do Ministério da Saúde (2019, pág. 2), as lesões podem apresentar três formas, sendo elas: lesão incharacterística, lesão sugestiva de lesão característica. Na lesão incharacterística apresenta sintomas gerais como bolhas com conteúdo seroso, edema, calor e rubor, com ou sem queimação ou dor. Lesão sugestiva, indica quais seriam as causas, mas ainda apresentam sintomas muito gerais como: endureção bolha, equimose e dor em queimação. Já a lesão característica tem sintomas mais específicos para acidentes com aranhas marrons, sendo dor em queimação, lesões hemorrágicas no foco na picada, mescladas com áreas pálidas de isquemia e necrose (figura 5).

E outra forma que pode se manifestar é a forma Cutâneo-Visceral ou Hemolítica: além do comprometimento cutâneo, apresenta manifestações decorrentes da hemólise intravascular como anemia, icterícia e hemoglobinúria entre as primeiras 24 horas. Casos graves podem evoluir para insuficiência renal aguda, apesar de ser um a 13% dos casos, é a principal causa de óbito decorrente do loxoscelismo (Secretária de Saúde do Paraná 2019).

Figura 5 – Fotos de lesões causadas pelo veneno da picada de *Loxocceles*

Fonte: <https://www.jornaldoestadoms.com/2016/06/cuidado-confira-algumas-curiosidades.html>

Dado o fato de os acidentes com aranhas estarem presentes no cotidiano das populações humanas e afetando a saúde pública, é extremamente importante que haja estudos na área da biologia das aranhas. Nesse sentido, o estudo morfológico e histoquímico vem agregar conhecimento, por ser uma ferramenta importante, já que esses animais são pequenos e, portanto, difíceis de serem estudados.

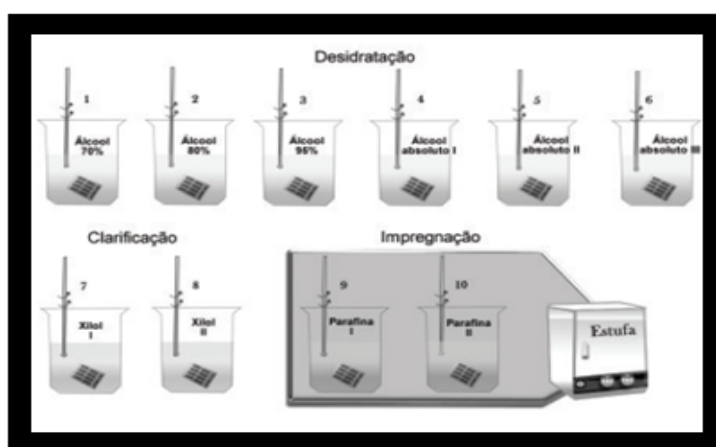
Diversos estudos podem contribuir para o desenvolvimento futuro de métodos de controle deste gênero e assim, alcançar uma redução nos casos de acidentes em perímetro urbano, mas para isso uma metodologia deve ser escolhida. Neste trabalho foi levado em conta o tamanho diminuto dos espécimes escolhidos, e o objetivo de estudar sua morfologia interna, foi preferível a utilização dos métodos da histologia, no auxílio do conhecimento morfológico e anatômico das estruturas que podem diferir entre as espécies, e até entre famílias e gêneros (AZEVEDO, 2007).

A histologia, se preocupa com o estudo dos tecidos e como se organizam para formar os órgãos. Os organismos vivos multicelulares são constituídos por quatro tipos básicos de tecidos: epitelial, nervoso, conjuntivo e muscular (JUNQUEIRA, 2008). Cada tecido é formado por arranjos de células com as mesmas características ou funções. Com o pequeno tamanho das células e componentes presentes em tecidos, a histologia se faz com o auxílio do microscópio (a imagem vista se forma depois que um feixe de luz atravessa alguma estrutura ou

tecido, que quanto mais delgada, melhor a imagem a ser vista), dessa maneira é possível estudar experimentalmente estruturas com centímetros, milímetros ou micrômetros de tamanho (JUNQUEIRA, 2008). Para que se faça um estudo histológico é necessário realizar uma série de procedimentos até que o material esteja pronto para ser visualizado em microscópio de luz. São esses: fixação, desidratação, impregnação e inclusão, cortes e colagem, coloração e por último a montagem.

Os métodos de fixação consistem em assegurar a conservação morfológica dos elementos anatómicos e torná-los aptos a uma coloração específica (BEÇAK, 1976.) Para que isso ocorra, é necessário um fixador de qualidade, que precisa ter bom poder de penetração no tecido escolhido e precisa produzir uma coagulação das proteínas de forma imediata, fracionada a fim de evitar contrações. Mas para a boa preservação não pode ocorrer o escurecimento do tecido, encolhimento ou frigidez (BEÇAK, 1976). Nos procedimentos de impregnação, consiste na difusão de reagentes para o interior dos tecidos para a remoção do líquido tecidual, para isso ocorrem diversas baterias de reagentes, como mostra a figura 6, para a total remoção dos líquidos. O processamento/incrustação deixa os tecidos rígidos, capaz de serem feitos cortes de fatias finas e delicadas para a observação ao microscópio, então comumente é usado parafina, mas há outras diversas substâncias que podem ser utilizadas. Após isso se coloca a peça na parafina e se coloca na posição escolhida para o corte (MOLINARO, 2010).

Figura 6 – Ilustração de como é feito o Processamento/incrustação de um tecido em parafina.



Fonte: Molinaro pág. 121, 2010.

Os cortes para serem vistos em microscópios de luz devem ser finos e uniformes, com uma espessura que varia entre 4 a 6 μm . Para isso, se usa um equipamento chamado Micrótomo, um aparelho constituído por três partes: corpo, porta-bloco e porta-objeto. Considera-se que possui duas manivelas, uma de ajuste e outra de corte. O funcionamento pode ocorrer de duas formas: quando o material no porta-objeto, vai de encontro a uma navalha imóvel (Tipo Minot), e quando o porta-navalha vai de encontro o material fixo no porta-objeto imóvel, então chamado de tipo corrediça (MOLINARO, 2010). Foram feitos diversos tipos de micrótomos específicos para cortes tanto em parafina, blocos congelados e cortes específicos para outros tipos de microscópios. Então se estendem os cortes em água morna e se fixa na lâmina, esperando o corte secar.

A coloração é feita por compostos orgânicos, aromáticos e ionizáveis, fundamentalmente baseados na estrutura do benzeno formados pelo cromógeno e auxocromo e coram seletivamente os componentes celulares, e são utilizados em tecidos previamente fixados, sendo necessários após a microtomia porque os tecidos são habitualmente transparentes. Os diferentes tipos de corantes histológicos podem corar tecidos não vivos e vivos, mas nestes tendo cuidados de não causar danos à célula e não interferir no metabolismo celular (MOLINARO, 2010).

Dentro da histologia, existe outro foco de estudo: que descrevem métodos de coloração que identificam substâncias químicas em cortes histológicos, chamada histoquímica. Tem como exemplo o método de coloração em PAS, que o ácido periódico oxida polissacarídeos neutros, expondo grupos aldeídos gerando a cor rósea ao material.

Então a lâmina é montada, o corte é colocado entre uma lâmina e uma lamínula, tendo entre elas também outros tipos de reagentes em que, dependendo do material pode-se usar Óleo de Imersão, Bálsamo do Canadá, entre outros.

4 JUSTIFICATIVA

As aranhas marrons são um problema na saúde pública paranaense. Devido às diversas campanhas de conscientização, o número de casos não tem sofrido alteração, porém é importante ressaltar que não há queda, pelo motivo do desenvolvimento dos hábitos cosmopolitas adquiridos pelas aranhas *Loxosceles*, e pelo seu tamanho reduzido. Estudar métodos para que sua anatomia interna seja mais conhecida e entender melhor como está organizada internamente poderá ajudar futuramente em pesquisas para melhor compreensão dos métodos de controle e profilaxia.

5 METODOLOGIA

Foram coletadas no Município de Dois Vizinhos-Pr, 20 aranhas *Loxosceles*. As aranhas ainda vivas armazenadas em frascos de plásticos individuais (figura 7) foram conduzidas até o laboratório de Controle Biológico II da UTFPR-DV. Permaneceram por dois dias no frasco, contendo uma pequena bola de algodão umedecido em água de torneira até o dia previsto para a coleta do material, então foram anestesiadas com vapores de éter sulfúrico. Após anestesiadas, as aranhas foram submetidas à eutanásia através de perfuração do exoesqueleto do cefalotórax. Em seguida, suas pernas foram cortadas com uma lâmina de bisturi e com o auxílio de alfinete entomológico e pinça, sob estereomicroscópio, para melhor penetração do fixador Carnoy. Para esse trabalho foram usadas metodologias descritas por Molinaro, (MOLINARO, ETELCIA MORAES 2010).

As amostras permaneceram em fixador por 2 horas em temperatura ambiente, e após isso, o cefalotórax e o abdome foram preservados em álcool etílico 70%, até o momento da inclusão, sendo por volta de uma semana de diferença entre as etapas.

Figura 7: Aranhas *Loxosceles* capturadas para a histologia.



Fonte: autoria própria, 2021.

Em seguida, os 20 espécimes foram distribuídos igualmente em quatro grupos de estudo:

- Grupo 1- Inclusão em Parafina com cera de abelha e coloração de Hematoxilina e Eosina.
- Grupo 2- Inclusão em Parafina com cera de abelha e histoquímica de PAS.
- Grupo 3- Inclusão em Histoiresina e coloração de Hematoxilina e Eosina.
- Grupo 4- Inclusão em Histoiresina e Histoquímica de PAS.

E seguiram para os próximos procedimentos, de acordo com o meio de inclusão escolhido

5.1 Inclusão em parafina com cera de abelha

Após a desidratação em etanol, o material biológico foi submetido à diafanização (substituição do álcool presente no material por solvente específico para a parafina), utilizando dois banhos de xilol (I e II), por uma hora em cada, para melhor penetração do xilol. Em seguida, foi realizada a impregnação por parafina com cera de abelha em estufa a 60°C por uma hora, então a parafina com cera de abelha foi trocada e o material permaneceu por mais duas horas. A inclusão foi realizada colocando o material biológico na posição que se desejava realizar o corte, em molde de papel (dobrado manualmente) contendo parafina e cera de abelha líquida. Então, deixou-se em temperatura ambiente até a solidificação da parafina+cera de abelha. Estes blocos foram mantidos em geladeira até o momento da microtomia.

5.2 Inclusão em Histoiresina

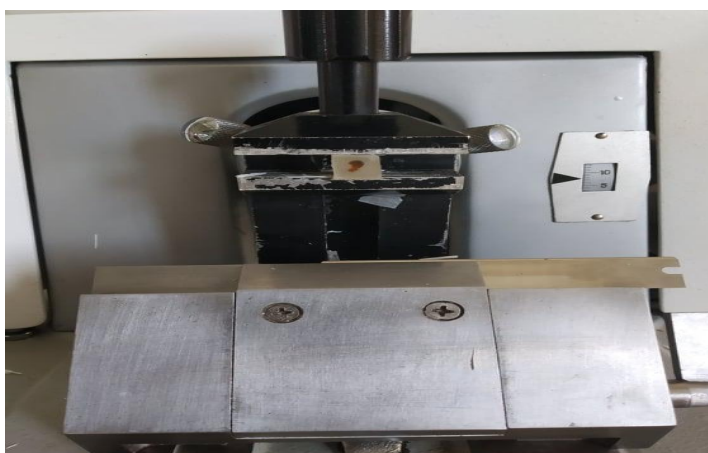
Para os grupos 3 e 4, após a fixação por três horas em geladeira, o material foi lavado em solução tampão por dez minutos. Então os espécimes foram desidratados em bateria crescente de álcoois (50%, 70%, 80%, 90%), e uma solução com proporção de 1:1 de álcool 100% e histoiresina por duas horas. Após foi deixada em histoiresina pura em geladeira por uma semana. No final do processo de emblocagem foram utilizadas duas soluções: uma solução de infiltração (50ml de resina e 0,6g de pó ativador) deixando o espécime mergulhado por 24 horas. Após isso, o material foi posicionado no molde com a solução de emblocagem (15ml de solução de infiltração e 1 ml de endurecedor). Esse molde com o material e a solução de emblocagem foi colocado em dessecador conectado à bomba de vácuo,

que foi ligada por dez minutos até que o vácuo fosse estabelecido. O material permaneceu no vácuo em dessecador por 24 horas, até a completa polimerização da historesina.

5.3 Microtomia

Para a microtomia, foi utilizado o micrótomo rotativo manual (micrótomo manual YD 315) configurado com a espessura de 5 μm para os cortes em ambos os meios de inclusão (figura 8). Cortes de parafina+cera de abelha foram distendidos em água morna em um banho maria histológico com temperatura entre 35°-40°C. Enquanto os cortes de Historesina foram distendidos em gotas de água destilada sobre lâmina gelatinizada. Depois de secas, as lâminas foram destinadas para as colorações: para o grupo 1 e 3 foi feita a coloração com Hematoxilina e Eosina, para grupos 2 e 4, foi feita a coloração histoquímica de PAS.

Figura 8: Micrótomo com o bloco de parafina para cortes.



Fonte: autoria própria, 2021.

5.4 Preparo do material em parafina com cera de abelha para as colorações

Independentemente do método de coloração escolhido, o material (cortes) deve ser preparado para receber a coloração. Essa preparação consistiu em hidratar os cortes, pois os corantes são soluções aquosas.

Assim, para os cortes em parafina com cera de abelha, as lâminas contendo os cortes foram submetidas a duas baterias de Xilol I e Xilol II por 15 minutos cada. Em

seguida, foram conduzidas para hidratação do material em série decrescente de álcool (100%II, 100%I, 95%, 90%, 80%, 70%) por cinco minutos cada.

5.5 Preparo do material em Historesina para as colorações

A preparação dos cortes de Historesina, se deu através da imersão direta das lâminas contendo os cortes em água destilada, para sua completa hidratação.

5.6 Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)

Na sequência, as lâminas contendo os cortes já hidratados (tanto de parafina com cera de abelha como de Historesina) foram mergulhadas em Hematoxilina filtrada por apenas dois minutos, e após isso, foram lavados em água corrente por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela Eosina por quatro minutos e após isso, foram lavados em água corrente rapidamente.

Então, em seguida, os cortes de parafina com cera de abelha foram desidratados em série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95% 100%I, 100%II) por cinco minutos. Na sequência, os cortes foram diafanizados com Xilol I e Xilol II por quinze minutos e montados com bálsamo do Canadá e lamínula.

Já os cortes de Historesina, após a coloração, foram armazenados à temperatura ambiente até a completa secagem e, em seguida, foram montados com bálsamo do Canadá e lamínula.

Os corantes foram produzidos no laboratório de Controle Biológico, no campus UTFPR-DV pela aluna, utilizando Molinaro (2010):

Eosina Alcoólica (Floxina)

- Etanol 95%;
- Eosina 1% - em água destilada;
- Floxina 1% - em água destilada;
- Ácido acético glacial.

Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina;
- Álcool etílico 95%;
- Alúmen de Potássio;
- Água deionizada;
- Óxido de mercúrio amarelo;
- Ácido acético glacial;

Preparo da Eosina: Colocar todos os reagentes em um béquer e mexer com bastão de vidro até ficar homogêneo.

Preparo da Hematoxilina: Em um fogão ou chama, dissolva o alúmen de potássio em água deionizada fervente, depois adicione hematoxilina triturada e óxido de mercúrio. Aumente a chama para que ferva mais rápido, mas após, desligue a chama e coloque a panela em água fria para esfriar rapidamente. Filtre e adicione o ácido acético glacial.

5.7 Histoquímica pelo método de PAS:

Para a análise histoquímica do projeto foi feita a coloração de PAS (Método do ácido periódico + reativo de Schiff).

5.8 Coloração pelo método PAS

O material foi mergulhado no reagente de Schiff em ambiente escuro por 15 minutos. Em seguida, mergulhado em três trocas de solução sulfurosa por cinco minutos cada (que foram desprezados após o uso), e lavados por quatro minutos em água destilada.

Em seguida, foi corada com Hematoxilina filtrada por 10 minutos, e após isso, foram lavados em água corrente por 10 minutos. Então, em seguida, os cortes que foram feitos em parafina com cera de abelha foram desidratados em série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, 95% 100%I, 100%II) por cinco minutos. Na sequência, os cortes foram diafanizados com Xilol I e Xilol II por quinze minutos e montados com bálsamo do Canadá e lamínula.

Os cortes que utilizaram a Histoiresina, após a coloração, foram armazenados à temperatura ambiente até a completa secagem e, em seguida, foram montados com bálsamo do Canadá e lamínula.

Os corantes foram produzidos no laboratório de Controle Biológico, no campus UTFPR-DV pela aluna, utilizando como base Molinaro (2010):

Soluções:**Ácido Periódico 0,5%****Reagente de Schiff:**

- Fucsina básica;
- Metabissulfito ou bissulfito de sódio;
- Água destilada;
- Ácido clorídrico 1 N.

Solução sulfurosa;**Solução estoque:**

- Metabissulfito ou bissulfito de potássio;
- Água destilada;
- Ácido clorídrico 1 N.

Solução de uso:

- Solução estoque;
- Água destilada.

Preparo do Reagente de Schiff: Dissolver em 200 mL de água destilada quente, 1 g de fucsina básica e esperar entrar em ebulição. Após, desligue e deixe esfriar até 50 °C. Adicionar 2 g de metabissulfito ou dissulfito ou bissulfito de sódio anidro. Filtrar. Colocar uma pitada de metabissulfito de sódio anidro e em seguida adicionar 20 mL de ácido clorídrico 1 N. Agitar, esfriar e guardar na geladeira em frasco âmbar ou envolvido em papel alumínio.

Preparo da solução sulfurosa: Colocar todos os reagentes em um béquer e mexer com bastão de vidro até ficar homogêneo.

5.9 Análise e registro fotográfico

Para a análise qualitativa e registro fotográfico do material, foi utilizado o microscópio óptico com sistema de captura de imagem no laboratório de ecologia da UTFPR, modelo Primo star hall Zeiss Software Zen Lite, versão 3.2. Durante a análise, os cortes dos diferentes grupos foram comparados entre si para determinar quais dos grupos apresentam a melhor preservação da organização morfológica, se

a penetração do fixador foi concluída com sucesso, se a inclusão com parafina ou Histo-resina se deu de forma correta e a qual coloração foi melhor para destacar a estrutura alvo (gânglio nervoso).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como no Brasil o acidente loxoscélico é um problema de saúde pública, diversas pesquisas foram feitas para estudar a histologia ao longo do tempo, como BUCHERL (1964), SANTOS (2000) entre outros. Determinar corretamente a anatomia interna e externa das diferentes aranhas do gênero *Loxosceles* é essencial para determinação de regiões onde estarão mais concentradas, pois de acordo com AQUINO (2016) *L. intermedia* tem a peçonha com maior potência, e *L. laeta* possui a peçonha com menor grau de periculosidade, mas com um potencial dermonecrótico e hemolítico acentuado em relação das outras do gênero. Tendo em vista que são um problema para a saúde pública, ressalta-se que sua identificação tem um grau de importância acentuado, porém poucos trabalham com como tema sua anatomia interna, como ressalta MORISHITA (2003),

Existem vários métodos diferentes de preparo de material biológico para análise microscópica. Esses métodos podem variar entre o método de fixação, inclusão, coloração e até a escolha da lâmina, sempre de acordo com o tamanho do espécime escolhido, com a espessura do exoesqueleto entre outros fatores.

Cada etapa pode variar, MORISHITA (2003) utilizou um método de fixação física, utilizando micro-ondas, onde o material estava imerso em solução fixadora e então aquecido, e para determinar seu tempo de exposição, foi usado a mudança de coloração da solução fixadora como parâmetro.

Para coloração diversos autores, como BURGER (2006), SCHAIDER (2010) e MORISHITA (2003) utilizaram o azul de toluidina que é responsável por corar os grânulos metacromáticos dos mastócitos em azul, para diversos aracnídeos, como pode ser utilizado para opiliões. Assim, quanto mais metodologias diferentes forem padronizadas, maior será a gama de possibilidades para ampliar o conhecimento acerca da organização interna de diferentes espécies.

Para o trabalho realizado, foram utilizados os métodos mais comuns de preparação histotécnica, com o micrótomo rotativo para os cortes. Por isso se utilizou a coloração de Hematoxilina+Eosina como também utilizado por SANTOS (2000), pois é um método anóptico que não evidencia uma estrutura alvo, mas irá colorir o tecido de maneira que se possa estudar os aspectos de sua morfologia geral.

Para se obter os resultados foram usados dois métodos de inclusão e dois métodos comumente utilizados de coloração (um deles histoquímico). Esses métodos foram escolhidos com a finalidade de evidenciar a estrutura morfológica do gânglio nervoso, localizado no sistema nervoso central de *Loxosceles*, nos quais outros trabalhos como SANTOS (2000) e BURGER (2006) escolheram outra estrutura alvo para os testes, mas utilizaram a mesma metodologia para a coloração na realização dos experimentos, desta forma é possível observar que seus resultados apresentam similaridades com relação à coloração dos resultados que aqui são apresentados.

Foram comparadas a preservação tecidual em dois tipos de inclusão (parafina+cera de abelha e historesina) e a coloração utilizando dois métodos: Hematoxilina e Eosina (HE), e a coloração de PAS ou reação de Ácido periódico de Schiff (PAS).

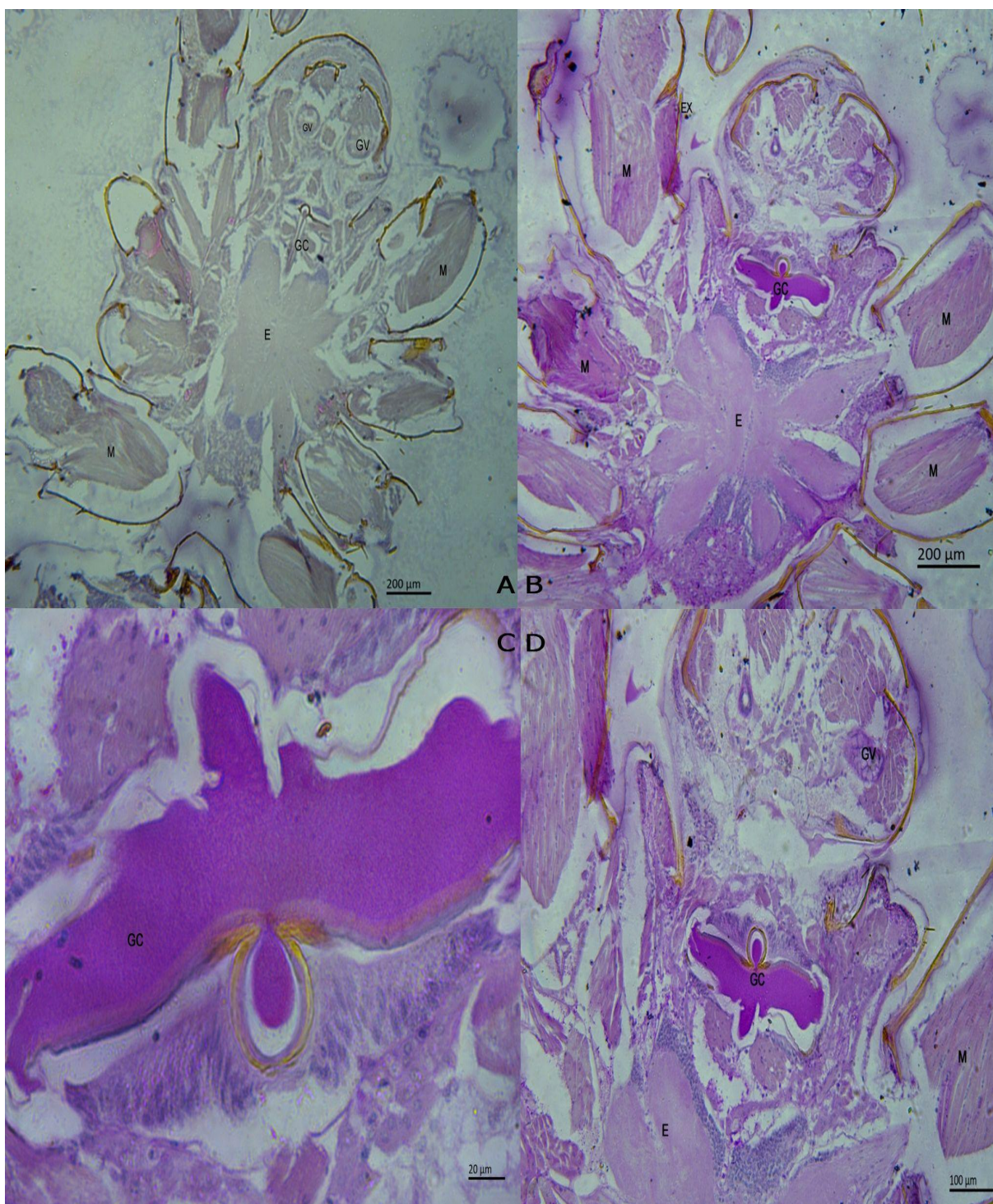
6.1 Análise morfológica dos métodos de inclusão

6.1.1 Inclusão em parafina com cera de abelha 3:1

Foi um processo tranquilo e de fácil manuseio, com alto aproveitamento de material e custo relativamente baixo. Além disso, todo o processamento de inclusão pôde ser inteiramente feito em apenas um dia (do início da inclusão até o bloco definitivamente). Dessa forma é possível concluir que se trata de um método muito eficaz tanto para alunos iniciantes na histologia como para alunos e pesquisadores com experiência.

Os blocos ficaram sem bolhas de ar e a impregnação foi completa, o que deixou os cortes uniformes, obtendo-se uma boa preservação interna e externa de diversas estruturas no geral (Figura 9). Foi possível observar a estrutura alvo, o gânglio nervoso, localizado centralmente no cefalotórax, tanto em cortes transversais como longitudinais.

Figura 9 - Cortes histológicos longitudinais de *Loxosceles*, incluída em parafina e cera de abelha (prop 3:1), corados Hematoxilina e Eosina (A), e marcados histoquimicamente com PAS (B, C e D), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC: Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto.

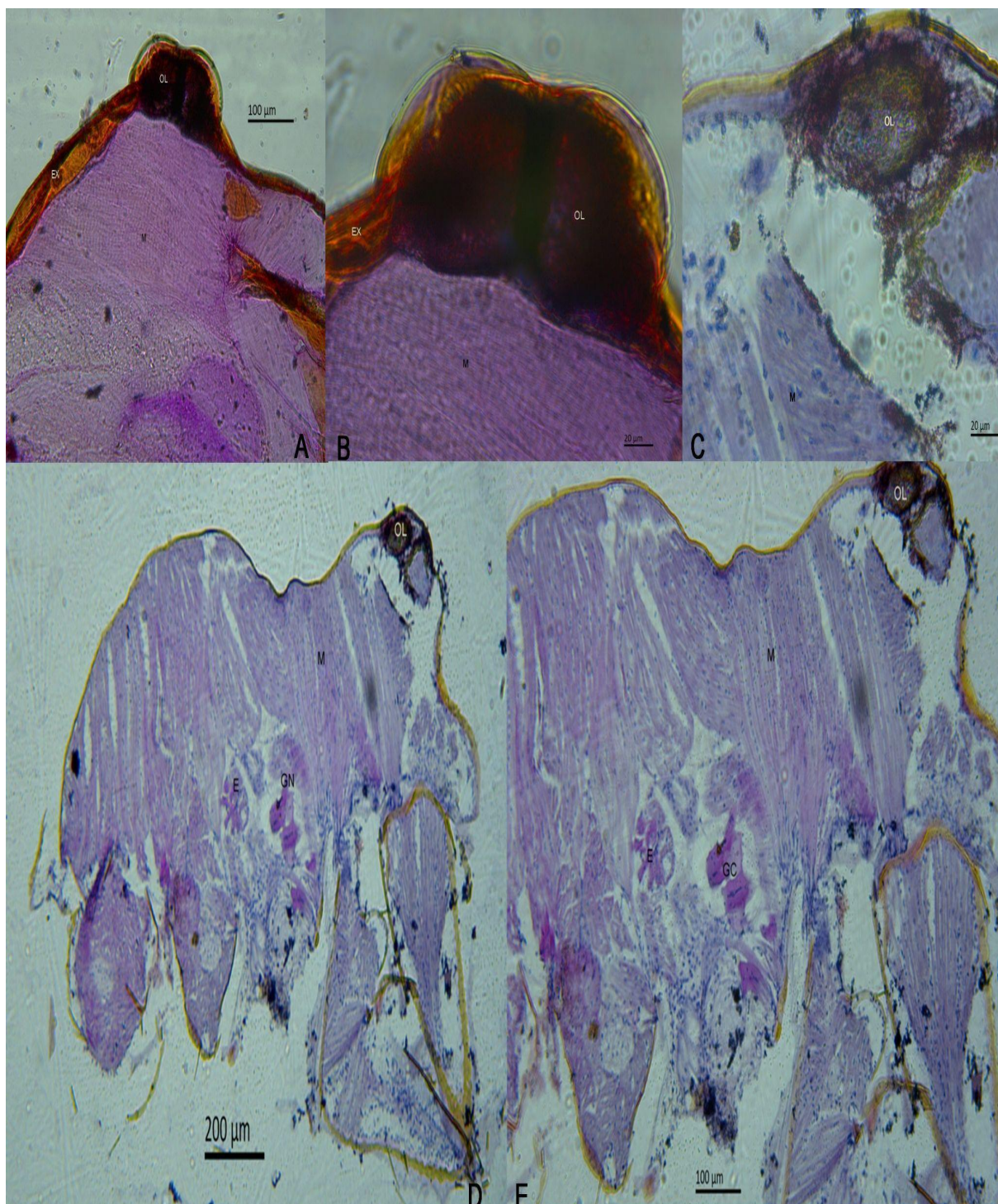


Fonte: autoria própria, 2022.

6.1.2 Inclusão em Histoiresina

Em diversos outros trabalhos como BURGER (2006), se mostrou muito mais eficiente na preservação da estrutura morfológica do que a parafina, porém é um método de alto custo que demanda experiência prévia do pesquisador. Sendo um processo de inclusão mais longo, e ainda pouco utilizado no laboratório onde houve o trabalho. Ocorreram erros fundamentais nos quais deixaram os grupos com histoiresina afetados e com pouca chance de análise morfológica, erros tais como: muito pó endurecedor no processo, muito tempo de espera para fazer os cortes no micrótomo dificuldade em orientar o material no meio de inclusão e pouco treinamento da aluna pesquisadora para cortes com esse tipo de material. Somente as colorações foram bem sucedidas (Figura 10).

Figura 10- Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em Histoiresina, marcados histoquimicamente com PAS (imagens A, B, C, D e E), em microscópio de luz. GV: Glândula de veneno, GC: Gânglio Nervoso. E: Estômago. M: Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto.



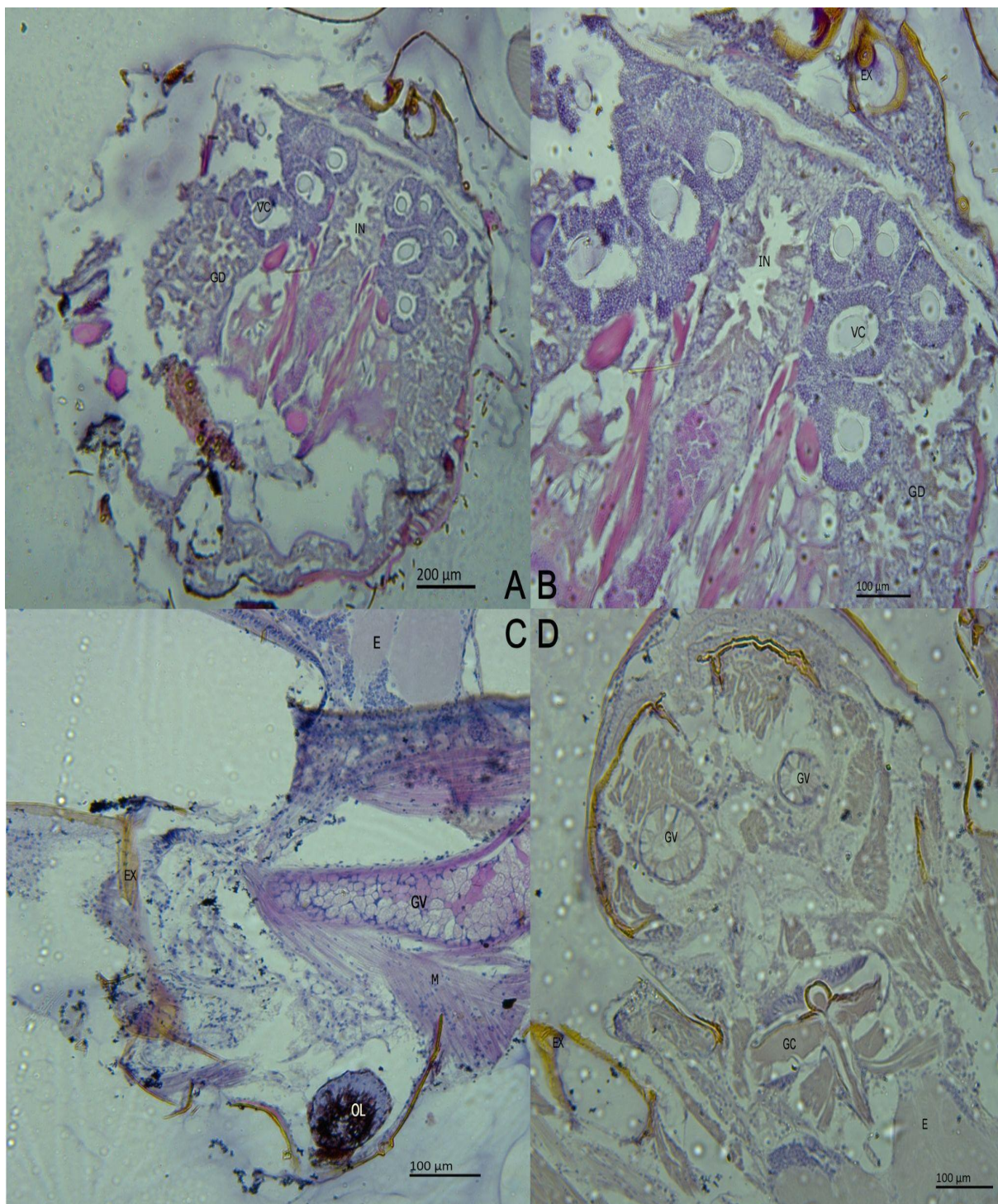
Fonte: autoria própria, 2022.

6.2 Análise morfológica dos métodos de coloração:

6.2.1 HE

A hematoxilina é um corante básico que, por afinidade ácido-base, coram em roxo estruturas ácidas nos tecidos, pois são basófilas. Como exemplos de estruturas basófilas temos o núcleo (ácidos nucleicos) e retículos endoplasmáticos rugosos (ribossomos). Já a eosina é um corante ácido que por afinidade ácido-base, cora em rosáceos estruturas básicas nos tecidos, pois são acidófilas. Tem como exemplo de estruturas acidófilas o interior celular e fibras de colágeno.

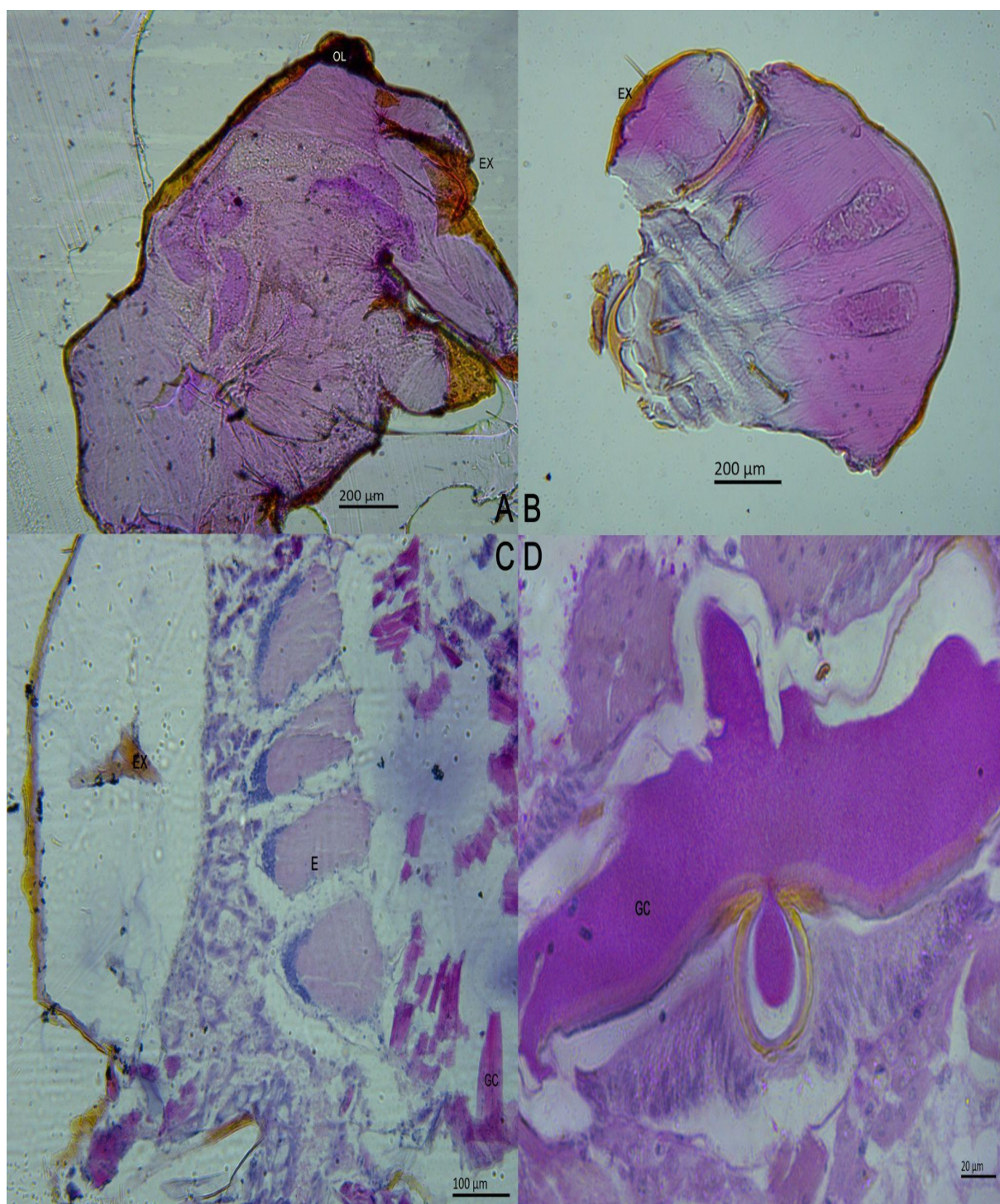
Figura 11 - Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em parafina e cera de abelha, prop 3:1 (A, B e D) e Historesina (C), corados Hematoxilina e Eosina (A, B e D), e marcados histoquimicamente com PAS (C), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto.



6.2.2 PAS

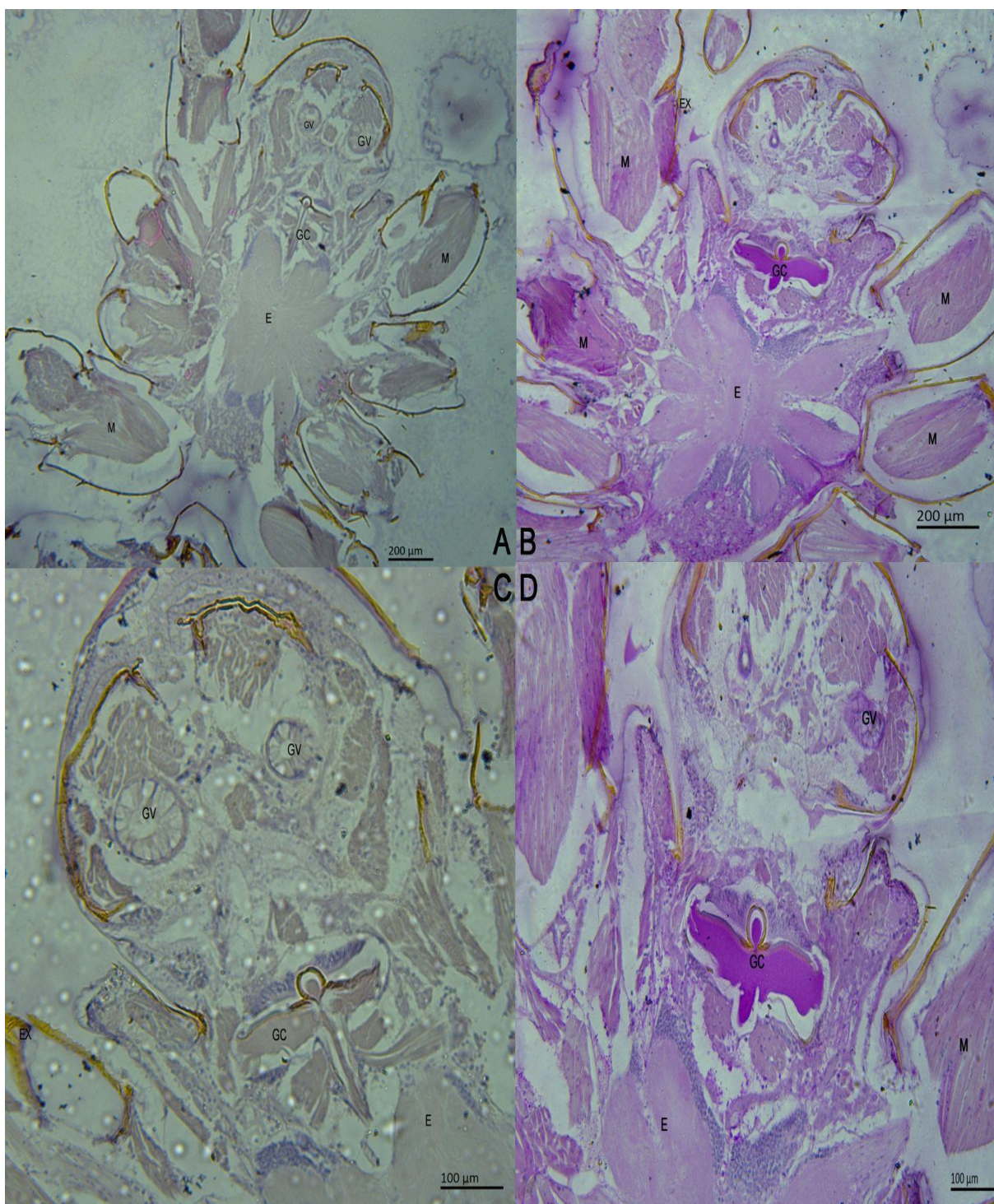
É uma reação histoquímica usada para identificar substâncias químicas em seções de tecido, no qual o ácido periódico oxida polissacarídeos neutros, expondo grupos aldeídos, fazendo com que o material se destaque com a cor rosa. Foi utilizada junto desta a contra coloração por hematoxilina para dar o contraste em roxo para o núcleo celular com propriedades basofílicas. Como foi observado na figura 12, a coloração evidenciou de maneira satisfatória o gânglio nervoso, pois demonstrando que nessa região há polissacarídeos neutros. Além disso, a positividade ao PAS facilitou a visualização em microscópio de luz, o que favoreceu visualizar o gânglio nervoso (figura 13).

Figura 12- Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em parafina e cera de abelha (prop 3:1), corados Hematoxilina e Eosina (A), e marcados histoquimicamente com PAS (B, C e D), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago, M:Músculo, OL: Olho composto e EX: Exoesqueleto.



Fonte: autoria própria, 2022.

Figura 13 - Cortes histológicos de *Loxosceles*, cortados transversalmente e incluídos em parafina e cera de abelha (prop 3:1), corados Hematoxilina e Eosina (imagem A), e marcados histoquimicamente com PAS (imagens B, C e D), em microscópio de luz. GV:Glândula de veneno, GC:Gânglio Nervoso. E: Estômago. M:Músculo. OL: Olho composto. EX: Exoesqueleto.



7 CONCLUSÕES FINAIS

Foi possível concluir que:

- O método de inclusão que melhor preservou os tecidos foi a parafina com cera de abelha (proporção 3:1).
- A inclusão com historesina não teve o resultado esperado, devido à falta de experiência na metodologia.
- Em ambas as colorações foi possível visualizar satisfatoriamente o gânglio nervoso e demais tecidos adjacentes.
- A reação de PAS foi positiva para o gânglio nervoso, evidenciando a presença de polissacarídeos neutros na estrutura, o que favoreceu sua visualização em microscópio de luz.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, Dihego de Oliveira. ZANUNCIO, J.C. ZANUNCIO J.S Jr. MARTINS. G.F. MARQUES-SILVA. Solange. SOSSAI, M.F. SERRÃO, J.E. **Biochemical and Morphological Aspects of Salivary Glands of the Predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae)**, Departamento de Biologia Geral; Departamento de Biologia Animal; Universidade Federal de Viçosa; Av PH Rolfs s/n; Campus Universitário; jeserrao@ufv.br; 36570-000; Viçosa - MG - Brasil. 2007.

AQUINO, Priscilla Alves. **Diversidade molecular de Fosfolipases D da peçonha da aranha *Loxosceles laeta* peruana revelada por sequenciamento de nova geração e análise transcriptômica**. 2016. Dissertação (Pós- Graduação em Bioinformática) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016

BARNES, Robert D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo, SP : Roca, 1990.

BEÇAK, Willy. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro, Livros técnicos e Científicos, 1976.

BRUSCA, R&C. & BRUSCA, G.J. **Invertebrados**. 7a edição. Editora Guanabara Koogan. 2007.

BÜCHERL, WOLFGANG. HISTOLOGIA DAS GLANDULAS DE VENENO DE ALGUMAS ARANHAS E ESCORPIÕES. **Secção de Artrópodos Peçonhentos**, Instituto Butantan, São Paulo, p. 77-83, 7 jan. 1964.

BURGER, Matthias *et al.* **Complex Genital System of a Haplogyne Spider (Arachnida, Araneae, Tetrablemmidae) Indicates Internal Fertilization and Full Female Control Over Transferred Sperm**. JOURNAL OF MORPHOLOGY , [s. l.], n. 267, p. 166 –186, 2006.

DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. **Brown spiders and loxocelism**. *Toxicon*, v. 44, n. 7, p. 693-709, 2004.

FISCHER, Marta Luciane; SILVA, Emanuel Marques. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles Heinecken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae)* no Estado do Paraná**, [s. l.], v. 38, ed. 4, p. 331-335, 3 maio 2005.

Folha de Londrina. **O Paraná teve mais de quatro mil acidentes com aranhas-marrom**. Online pelo link <https://www.folhadelondrina.com.br/saude/parana-teve-mais-de-quatro-mil-acidentes-com-aranha-marrom-1026751.html>. Acesso em 17/08/19.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U. **Histologia básica**. 11a ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por aranhas**. [S. l.], 22 jun. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/acidentes-ofidicos/acidentes-por-aranhas>. Acesso em: 10 nov. 2021.

MARQUES, Mario Octávio Thá. **Envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*: revisão de casos e literatura**. Orientador: Prof.^a Dra. Denise Vilarinho Tambourgi. 2020. Dissertação de mestrado (Mestre em Ciências Médicas) - Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

MOLINARO, Etelcia Moraes. **Conceitos e métodos para a formação em laboratórios de saúde**. Vol, 2. Rio de Janeiro. EPSJV; IOC, 2010.

MORISHITA, Renata. **ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE OVÓCITOS E CÉLULAS FOLICULARES NO OVÁRIO DA ARANHA-MARROM, *Loxosceles intermedia***. 2003. Dissertação (Mestre em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

PLATNICK, N. I. **The world spider catalog, version**. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/>. Acesso em 14/08/2019.

RUPPERT, BARNES. Edward E, Robert D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo, SP: Roca, 2005.

SANTOS, Vera Lucia P. *et al.* **Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider)**, *Toxicon*, ed. 38, p. 265-285, 2000.

Secretária de Saúde do Paraná. **(Aranha) Acidentes**. Online pelo link <http://saude.pr.gov.br/modules/conteudo.php?conteudo=391>. Acesso em 18/08/2019, 2019.