

ROXANE WIRSCHUM SILVA

**ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*: CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE
DUAS ESPÉCIES OCORRENTES EM CURITIBA, PR**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética (BG016), como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro

**CURITIBA
2001**

Dedico este trabalho aos meus pais, Juarez e Dirce, pelo eterno e incansável apoio e ao Fernando, pelo seu amor, carinho e compreensão ...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro, pelos ensinamentos e, principalmente, pelo incentivo dado desde o início, pois sem estes, não seria possível a realização deste trabalho.

À Prof^a Débora do Rocio Klisiowicz (Departamento de Patologia Básica), pelas eternas conversas e trocas de idéias, as quais me serviram de ensinamento não só para a minha formação como Bióloga, mas também para a minha vida.

À Prof^a Doralice Maria Cella – IBC-UNESP/Rio Claro (Departamento de Biologia Celular e Molecular) – , pela receptividade, atenção destinadas a mim (na ocasião do estágio em Rio Claro) e colaboração para a realização deste trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Citogenética Animal da UFPR:

Iris Hass (mestranda), pela amizade, apoio, conversas e sugestões dadas para este trabalho;

Edivaldo H. C. de Oliveira (doutorando), pelo apoio e amizade;

Maria Cristina da Silva Cortinhas (mestranda), pela amizade, apoio e incentivo dados durante todo o período de realização deste trabalho;

Marcos Vinícius M. Ferrari (mestrando), pelo auxílio fornecido para as ilustrações deste trabalho;

Daniel, Rafael e Roger pelas opiniões e companheirismo destinados durante todo o período que estivemos trabalhando juntos no laboratório;

Elizabeth Maia, pela força dada desde o início desta caminhada.

Ao aluno de graduação em Ciências Biológicas da UNESP/ Rio Claro, Douglas de Araújo, pela amizade, auxílio e dicas para a realização preparações citológicas em aranhas.

Aos amigos da minha turma de graduação (97/2) pelo apoio, companheirismo e incentivo.

Ao LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos da UFPR), pelos exemplares cedidos para o estudo realizado neste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora desta monografia:

Prof^a Dr^a Marta Margarete Cestari, da Universidade Federal do Paraná, pelas correções e críticas feitas durante a análise do projeto desta monografia;

Prof^o Dr. Alberto Sérgio Fenocchio, professor visitante da Universidade Federal do Paraná e adjunto da Universidad Nacional de Misiones, pelas sugestões e auxílios dados para a realização deste trabalho.

À todos os meus familiares, aos meus irmãos Julianna e Cezar pelos conselhos, apoio e incentivos dados durante todo o meu curso de graduação.

À Deus, por ter me dado a oportunidade de estar aqui, neste mundo, realizando pequenas obras perto das muitas já realizadas por Ele.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais.....	1
1.2. O Gênero <i>Loxosceles</i>	2
1.2.1. Estudos Citogenéticos no Gênero <i>Loxosceles</i>	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Coleta do Material.....	9
3.2. Obtenção Cromossômica.....	9
3.3. Coloração Convencional.....	10
3.4. Bandeamento C.....	10
3.5. Análise do Material.....	11
3.6. Fotomicrografias.....	11
4. RESULTADOS.....	12
4.1. <i>Loxosceles intermedia</i> Mello-Leitão, 1934.....	13
4.1.1. Coloração convencional.....	13
4.1.2. Bandeamento C.....	16
4.2. <i>Loxosceles laeta</i> Nicolet, 1849.....	17
4.2.1. Coloração convencional.....	17
4.2.2. Bandeamento C.....	19
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÕES.....	24
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

RESUMO

As aranhas do gênero *Loxosceles* são pequenas, apresentam distribuição cosmopolita, hábitos noturnos e não agressivos. Na região metropolitana de Curitiba, são encontradas duas espécies de aranha marrom: *L. intermedia* e *L. laeta*. A primeira espécie é a mais abundante e responsável, nos últimos anos, por inúmeros acidentes denominados de Loxoscelismo. A ação do veneno é proteolítica e hemolítica causando manchas avermelhadas no local da picada, inchaço local, necroses epidérmicas e, em casos graves, anemias e insuficiência renal aguda. O presente trabalho tem como objetivo estudar citogeneticamente estas aranhas, através da coloração comum (Giemsa) e bandeamento C, em células pré-meióticas e meióticas. Exemplares foram coletados em domicílios e fornecidos pelo LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos) e as preparações citológicas obtidas de testículos de exemplares adultos. Os dados mostram que as duas espécies se caracterizam por apresentarem um número diplóide diferenciado entre os sexos: $2n=23$ nos machos e 24 nas fêmeas. Esta diferença no número diplóide é devido ao sistema cromossômico de determinação sexual – múltiplo do tipo X_1X_2Y (machos)/ $X_1X_1X_2X_2$ (fêmeas). A aplicação do bandeamento revelou que, em *L. intermedia*, a maioria dos bivalentes autossômicos apresenta banda C pericentromérica, o mesmo se verificando com os cromossomos sexuais, X_1 e X_2 . Já o cromossomo Y mostrou-se praticamente todo heterocromático. Em *L. laeta*, todos os cromossomos apresentaram bandas pericentroméricas conspícuas, sendo que o cromossomo Y, apresentou-se totalmente heterocromático. Células meióticas também apresentaram este padrão de bandamento. Na literatura inexistem dados a respeito do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva para *Loxosceles*, sendo, portanto, os dados aqui apresentados para *L. intermedia* e *L. laeta*, inéditos não só para estas espécies como para o gênero.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

As aranhas estão incluídas na ordem Araneae, que é uma das mais amplas dentro da classe Arachnida, pois inclui de 35 a 38.000 espécies conhecidas em nível taxonômico (BARNES & RUPPERT, 1996). Provavelmente surgiram há 400 milhões de anos atrás e no período Paleozóico alcançaram um grande desenvolvimento.

Habitam praticamente toda a Terra, incluindo algumas ilhas do Ártico, sendo que no Brasil estão registradas cerca de 4.000 espécies, mas as estimativas sugerem que esse número pode ser de 10.000 (BRESCOVIT, 1999).

Todas as aranhas conhecidas são predadoras e alimentam-se principalmente de insetos, podendo capturar também pequenos vertebrados. O corpo é dividido em duas partes: prossoma (cefalotórax), onde estão situadas quatro pares de pernas, e opistossoma (abdome arredondado) (BARNES & RUPPERT, 1996). As aranhas são muito importantes no ecossistema pois são predadoras capazes de regular a população de outros artrópodes, principalmente insetos, que quando em grande número, podem se tornar pragas.

A ordem Araneae divide-se em três subordens (Kaston, 1972; Pielou, 1979; Coddington & Levi, 1991, apud OLIVEIRA, 1998): Araneomorphae, com 90 famílias, possuindo 2.700 gêneros e 35.000 espécies, cujos representantes ocorrem em quase todas as regiões biogeográficas; Mygalomorphae, com 15 famílias, incluindo aproximadamente 260 gêneros e 2.200 espécies, sendo que a maioria dessas é da Região Neotropical, Paleotropical e Australiana; Mesothelae, com uma única família, Liphistiidae, contendo dois gêneros e cerca de 40 espécies, as quais ocorrem principalmente na Região Paleártica e Oriental.

Em relação às aranhas de interesse médico, os primeiros relatos de acidentes humanos causados por aranhas datam do século XVIII. O número conhecido de espécies venenosas, em todo o mundo, não ultrapassa a 30 e estão distribuídas nos gêneros *Phoneutria* (Ctenidae), conhecidas como aranha armadeira ou aranha das bananas, *Loxosceles* (Sicariidae), denominadas popularmente como aranhas marrons, *Lycosa* (Lycosidae), as aranhas de jardim, e *Latrodectus* (Theridiidae), as viúvas-negras ou flamenguinhas. Espécies não pertencentes aos grupos citados acima podem picar, porém geralmente a consequência é apenas uma dor local.

Os primeiros relatos citogenéticos em aranhas foram realizados no final do século XIX e início do XX (Carnoy, 1885; Wagner, 1896 e Bosenberg, 1904, 1905, apud OLIVEIRA, 1998), e serviram de incentivo para que outros pesquisadores começassem a realizar análises cariotípicas neste grupo de animais. Os dados existentes na literatura a respeito da ordem Araneae, mostram que apenas 1% das espécies são conhecidas cariotipicamente, envolvendo tanto o número diplóide como a morfologia e mecanismos cromossômicos de determinação sexual.

O número diplóide das espécies da ordem Araneae apresenta uma ampla variação, de $2n=7$ a $2n=94$ (OLIVEIRA, 1998), ao passo que o mecanismo cromossômico de determinação sexual do tipo X_1X_2 nos machos e $X_1X_1X_2X_2$ nas fêmeas, predomina em cerca de 84% das espécies citologicamente estudadas (WHITE, 1973). Atualmente sabe-se que aproximadamente 72% das espécies apresentam o tipo $X_1X_2/X_1X_1X_2X_2$, 9% X/XX , 9% $X_1X_2X_3/X_1X_1X_2X_2X_3X_3$, 1% $X_1X_2X_3Y/X_1X_1X_2X_2X_3X_3$ e 2% apresentam variações interindividuais intra ou interpopulacionais, sendo que apenas duas espécies revelam o tipo $X_1X_2X_3X_4/X_1X_1X_2X_2X_3X_3X_4X_4$ e duas o $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ (OLIVEIRA, 1998). Saliente-se que, em todos os casos, o número de cromossomos X nas fêmeas corresponde ao dobro daquele observado nos machos.

1.2. O Gênero *Loxosceles*:

O gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 caracteriza-se por apresentar aranhas pequenas e não agressivas. Elas possuem cerca de 16 mm de corpo, pernas longas e finas (FISCHER, 1996). Constróem uma teia irregular constituída por fios pegajosos, assemelhando-se a um algodão esfiapado. São de hábitos noturnos e têm como habitat natural sítios específicos tais como frestas, cascas de árvores e grutas. Este gênero inclui um grande número de espécies distribuídas no mundo inteiro, variando de 16 (BÜCHERL, 1960) a 30 (GERTSCH, 1967) na América do Sul. Seus centros de origem localizam-se na África e Américas, sendo que no Brasil são encontradas sete espécies (*L. adelaida* Gertsch, 1967, *L. amazonica* Gertsch, 1967, *L. gaucho* Gertsch, 1967, *L. hirsuta* Mello-Leitão, 1931, *L. intermedia* Mello-Leitão, 1934, *L. laeta* Nicolet, 1849, e *L. similis* Moenkhaus, 1898). No Paraná ocorrem quatro espécies (*L. gaucho*, *L. hirsuta*, *L. intermedia*, *L. laeta*),

sendo que duas delas (*L. intermedia* e *L. laeta*) estão presentes em Curitiba e região metropolitana.

Elas são denominadas popularmente de “aranha marrom” e, até meados da década de 30, eram consideradas inofensivas ao homem. No entanto, o seu veneno é considerado um dos mais ativos sobre o organismo humano, podendo provocar, inclusive, morte em vítimas que apresentam um certo quadro de subnutrição ou que demorem a serem medicadas.

No Peru, a espécie *L. laeta* é a causadora de inúmeros acidentes, muitas vezes fatais (SCHENONE et al., 1989), ao passo que Curitiba está entre as cidades com os maiores índices de acidentes loxoscélicos no Brasil, com um total de 100 casos em 1989 e mais de 1000 em 1992, conforme é mostrado na série Cadernos de Saúde, da Secretaria Municipal da Saúde de Curitiba (1993).

No aspecto epidemiológico, Curitiba destaca-se por apresentar ampla disseminação de aranha-marrom com predominância intradomiciliar, pois são encontradas freqüentemente sob tijolos, telhas, madeiras, entulhos, atrás de quadros e fendas das paredes.

Os acidentes correspondem em maior número aos causados por *L. intermedia* e, em menor freqüência, por *L. laeta* (RIBEIRO et al., 1991). A espécie *L. intermedia* (Fig. 1) é caracterizada principalmente por apresentar coloração marrom-avermelhada e abdome oval com tonalidade cinza-esverdeado (FISCHER, 1996). Já *L. laeta* (Fig. 2) caracteriza-se por apresentar um cefalotórax de coloração marrom-pálida, um pouco mais claro que o da outra espécie, sendo as características do abdome idênticas às da espécie anterior. Para ambas, a reação da picada é indolor e o acidente ocorre quando a aranha é comprimida contra o corpo do indivíduo. A ação do veneno é proteolítica e hemolítica, causando necrose local, edema, hemorragias, complicações renais e, raras vezes, podendo levar o indivíduo à morte.

No Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná estão sendo desenvolvidos vários projetos visando compreender melhor não só a biologia, como a biodiversidade de suas espécies e o comportamento destas aranhas, além de verificarem os efeitos deste veneno para fins medicinais. Entre estes, destacam-se o trabalho de SANTOS FILHO (2000) que sugere um efeito deletério sobre o endotélio dos vasos sangüíneos e o de SOUZA et al. (1998), inferindo que este veneno pode causar em suas vítimas, uma degradação parcial das moléculas de entactina e uma atividade de rompimento da membrana basal, que são propostas

como causadoras da deficiência renal e hemorragia comumente observadas nestes casos.

Outro trabalho interessante é o de FISCHER (1996) que visa determinar o ciclo biológico e alguns aspectos ecológicos importantes em *L. intermedia*, destacando-se comportamento copulatório, oviposição, fertilidade, desenvolvimento pós-embrionário, alimentação e fauna acompanhante e fenologia, que poderão ser utilizados em trabalhos de controle biológico desta espécie.

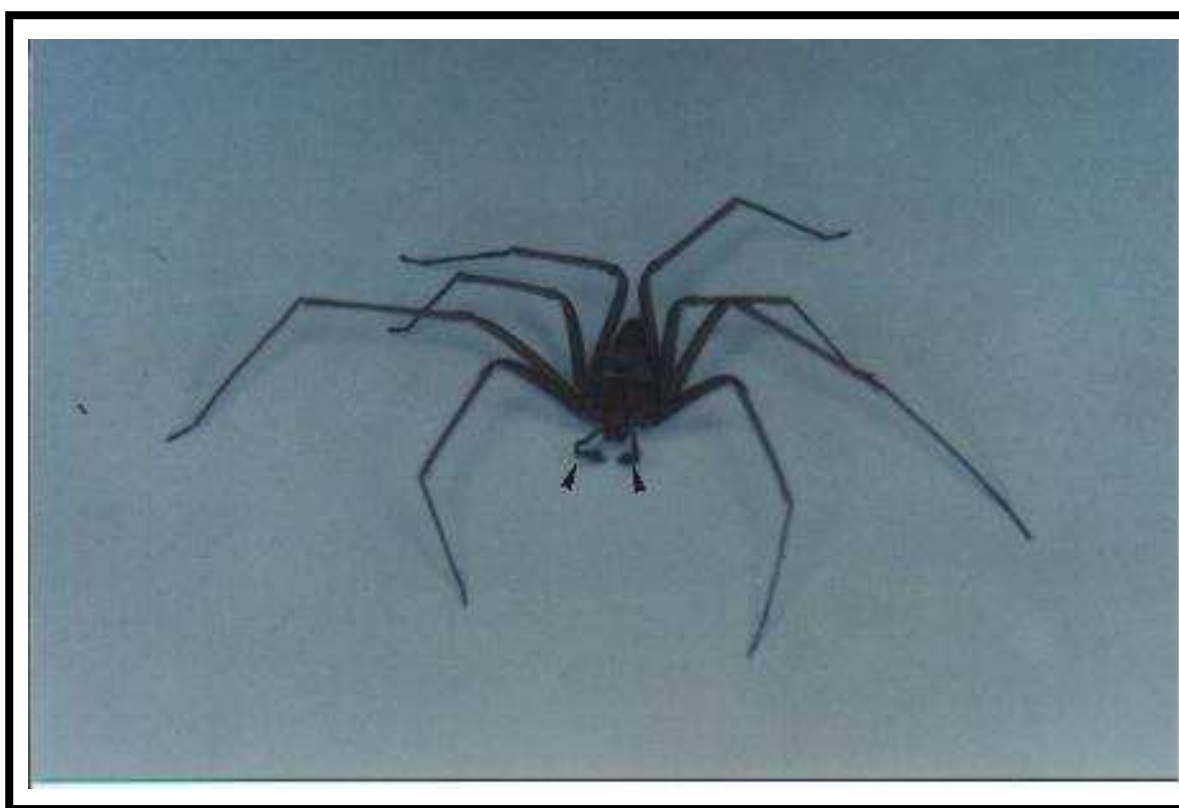


Figura 1a – Exemplar macho de *L. intermedia*. As setas apontam os pedipalpos, os quais são abaulados, caracterizando o sexo.



Figura 1b – Exemplar fêmea de *L. intermedia*. As setas apontam os pedipalpos, que diferente dos machos, não são abaulados.



Figura 1c – Casal de *L. intermedia*. M = macho; F = fêmea.



Figura 2a – Exemplo macho de *L. laeta*. As setas apontam os pedipalpos, os quais são abaulados, caracterizando o sexo.



Figura 2b – Exemplo fêmea de *L. laeta*. As setas apontam os pedipalpos, os quais, diferente dos machos, não são abaulados.



Figura 2c – Casal de *L. laeta*. M = macho; F = fêmea.

1.2.1. Estudos Citogenéticos no Gênero *Loxosceles*:

Os estudos citogenéticos neste gênero são escassos, destacando-se os trabalhos pioneiros em *L. rufipes* e *L. rufescens* (BEÇAK & BEÇAK, 1960; DIAS & SAÉZ, 1965, 1966), que mostraram o mesmo número diplóide ($2n=20$). Estas espécies provavelmente correspondem a *L. gaucho* e *L. laeta*, respectivamente, o que mostra uma certa confusão na identificação taxonômica das espécies deste gênero. Também foram estabelecidos os números cromossômicos em *L. reclusa* – machos $2n=18$, X_1X_2 e fêmeas $2n=20$, $X_1X_1X_2X_2$ – conforme TUGMON et al. (1990).

SILVA (1988), em uma análise preliminar em 50 exemplares de *L. laeta* coletados em áreas rurais de Lima (Peru), observou duas populações celulares, uma com 23 e outra com 24 cromossomos. Nas metáfases com 23 cromossomos, havia um elemento muito pequeno, semelhante a um cromossomo acrocêntrico, sendo que o restante dos cromossomos se apresentaram submetacêntricos. Na meiose

notou as presenças de 10 bivalentes autossômicos e um trivalente, os sexuais. Exemplares da mesma espécie foram estudados por OLIVEIRA (1998), onde metáfases mitóticas espermatogoniais, de cinco machos adultos, apresentaram o mesmo número diplóide ($2n=23$), sendo dez pares homomórficos (autossomos) e três cromossomos heteromórficos (sexuais). Nas células meióticas desses mesmos machos, confirmou-se a presença do sistema de determinação sexual do tipo X_1X_2Y .

Estudos feitos por OLIVEIRA et al. (1996) e OLIVEIRA (1998) com *L. gaucho*, coletada em São Roque – SP, encontraram-se, metáfases mitóticas com $2n=23$, sendo 10 pares cromossômicos homomórficos e 3 cromossomos heteromórficos. A análise de células meióticas evidenciou a ocorrência do sistema de determinação sexual do tipo X_1X_2Y , similar ao observado em *L. laeta*. Estes autores verificaram que em células metafásicas oogoniais de *L. gaucho* havia 24 cromossomos, correspondentes a 12 pares homomórficos, o que confirma a ocorrência do sistema de determinação sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2$ na fêmea.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os poucos trabalhos sobre citogenética em aranhas, em especial no gênero *Loxosceles*, com a inexistência de dados relativos aos padrões de bandeamento, este trabalho pretende:

- Estudar citogeneticamente as duas espécies de *Loxosceles* – *L. intermedia* e *L. laeta* –, ocorrentes na região metropolitana de Curitiba, através das aplicações das técnicas de colorações: convencional e bandeamento C;
- Comparar os dados obtidos neste trabalho com os descritos na literatura, não só para estas espécies como às outras espécies do gênero *Loxosceles*;
- Fornecer subsídios para uma melhor compreensão citotaxonômica dessas duas espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do Material

Os exemplares de *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*, foram coletados em domicílios de Curitiba ou fornecidos pelo LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2. Obtenção Cromossômica

As preparações citológicas, para o estudo de cromossomos mitóticos e meióticos, foram obtidas a partir de testículos de exemplares adultos e embriões.

a) A partir de testículos:

O material obtido por esta técnica – mitose e meiose – orientou a caracterização do cariótipo dos machos das duas espécies estudadas neste trabalho, seguindo as recomendações de OLIVEIRA (1998), com modificações:

- ◆ Em sala climatizada, remover o testículo em solução fisiológica para insetos (7,5g NaCl + 2,38g Na₂HPO₄ anidro + 2,72g KH₂PO₄, dissolvido em 1000ml de água destilada);
- ◆ Colocar o material em uma solução de colchicina a 0,1%, preparada com solução fisiológica para insetos, durante um período de 1 hora para que ocorra o acúmulo de metáfases;
- ◆ Adicionar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, para atuar como solução hipotônica, durante 15 minutos, à temperatura de aproximadamente 25°C ou colocar o material direto na água de torneira durante 5 minutos para hipotonização;
- ◆ Fixar em Carnoy I (metanol – ácido acético na proporção de 3:1), durante, no mínimo, 30 minutos;

- ◆ Colocar o testículo em uma lâmina, juntamente com uma gota de solução de ácido-acético a 60% e, com um bastão de alumínio, macerar o material até dissociar completamente e obter uma suspensão celular;
- ◆ Secar a lâmina em chama de lamparina, espalhando o material.

b) A partir de embriões:

As metáfases obtidas por esta técnica auxiliaram na montagem e descrição do cariótipo das fêmeas de *L. intermedia*, de acordo com a técnica de WEBB et al. (1978), com modificações:

- ◆ Remover o córion do ovo para a eliminação do embrião;
- ◆ Colocar o embrião em uma solução de colchicina a 0,1%, preparada com solução fisiológica para insetos, durante 2 horas, para que ocorra acúmulo de metáfases;
- ◆ Adicionar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, para atuar como solução hipotônica, durante 15 minutos, à temperatura de aproximadamente 25°C ou colocar o material direto na água de torneira durante 5 minutos para hipotonização;
- ◆ Fixar em Carnoy I (metanol – ácido acético na proporção de 3:1), durante, no mínimo, 30 minutos;
- ◆ Colocar o embrião em uma lâmina, juntamente com uma gota de solução de ácido-acético a 60% e, com um bastão de alumínio, macerar o material até dissociar completamente e obter uma suspensão celular;
- ◆ Secar a lâmina em chama de lamparina, espalhando o material.

3.3. Coloração Convencional – Giemsa

- ◆ Corar as lâminas com uma solução de Giemsa a 3%, em tampão fosfato (pH= 6,8), durante 7 minutos, à temperatura de 22°C aproximadamente;
- ◆ Lavar em água destilada e secar ao ar.

3.4. Bandeamento C

A técnica utilizada foi a de SUMNER (1972), com algumas modificações:

- ◆ Tratar a lâmina feita no dia, com solução de ácido clorídrico (0,2N) durante 2 minutos à temperatura de 43 a 45°C;
- ◆ Lavar com água destilada e secá-la ao ar;
- ◆ Colocar a lâmina, já seca, em solução de hidróxido de bário a 5% durante 15 segundos, à temperatura de 43 a 45°C;
- ◆ Lavar a lâmina em água destilada com jatos fortes;
- ◆ Colocar a lâmina em solução salina de 2XSSC, durante 15 minutos, à temperatura de 60-65°C;
- ◆ Lavar a lâmina várias vezes com água destilada e secá-la;
- ◆ Submeter a lâmina à coloração com Giemsa conforme descrito no item anterior com 7 minutos no corante.

3.5. Análise do Material

Para a determinação dos números diplóides (2n) foram analisadas, ao microscópio, em média, dez células por preparação. Destas, três foram fotomicrografadas para a montagem do cariótipo, sendo este montado a partir do tamanho dos cromossomos, ou seja, os pares foram ordenados do maior para o menor.

Para o bandejamento C, foram selecionadas e fotografadas as melhores metáfases para a caracterização do padrão. Foram comparadas entre si os cariótipos dos exemplares das espécies do presente trabalho – coloração convencional e bandejamento C – bem como entre estes e aqueles descritos na literatura.

3.6. Fotomicrografias

As células selecionadas foram fotografadas em microscópio Carl Zeiss, em objetiva 100 de imersão. O filme empregado foi o IMAGELINK e para a revelação Dektol diluído em água (1:1).

As cópias das fotos foram feitas em papel Kodak F-3 e reveladas em Dektol diluído em água (1:3).

4. RESULTADOS

As células metafásicas espermatogoniais analisadas tanto de *Loxosceles intermedia* (Fig. 3b) como de *Loxosceles laeta* (Fig. 4) mostraram $2n=23$, sendo possível identificar-se dez pares de cromossomos homomórficos e três cromossomos heteromórficos. Análises feitas a partir de células meióticas destes indivíduos revelou a ocorrência de dez bivalentes mais um trivalente, evidenciando, assim, que os três cromossomos heteromórficos são os sexuais – dois Xs (X_1 e X_2) e o Y. A análise em células “ovos” mostrou 12 pares homomórficos (Fig. 3a), confirmando o sistema cromossômico múltiplo do tipo $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$.

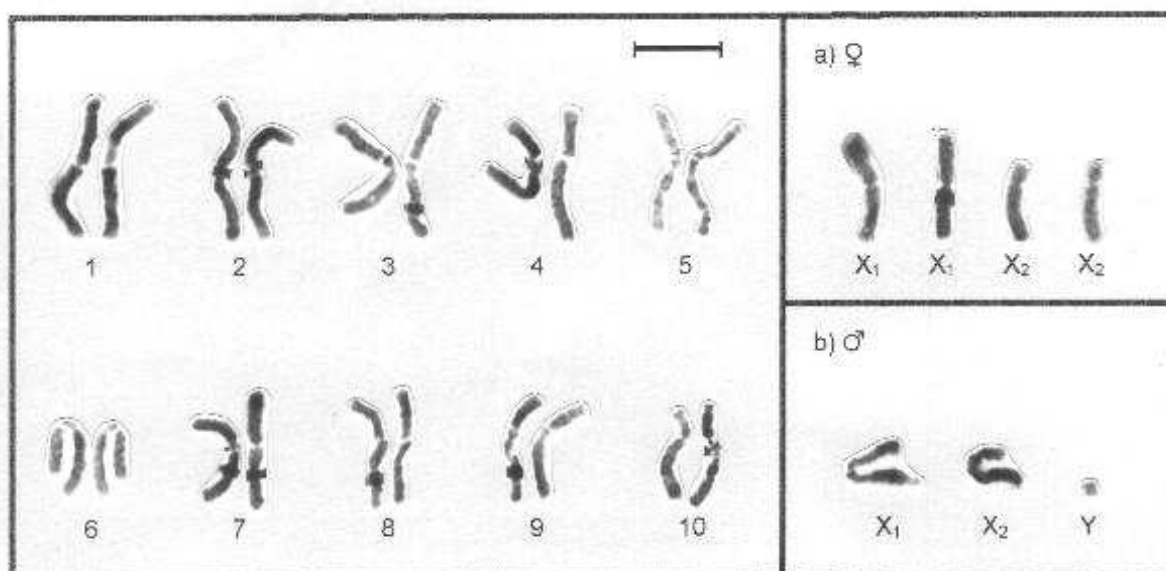


Figura 3 – Cariótipo de *L. intermedia* evidenciando os 10 pares de autossomos, os cromossomos sexuais femininos (a) e os sexuais masculinos (b). Barra=10 μ m.

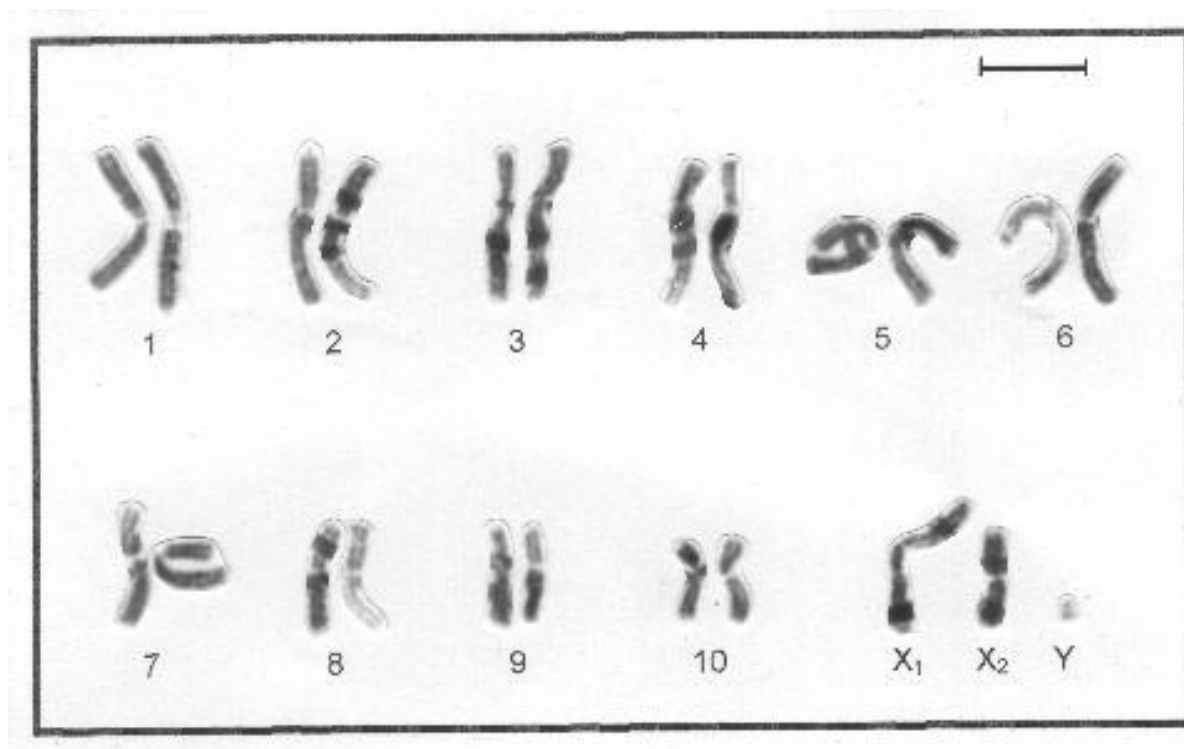


Figura 4 – Cariótipo de *L. laeta* evidenciando os 10 pares de autossomos e os 3 sexuais. Barra=10µm.

4.1. *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934

4.1.1. Coloração Convencional

As metáfases mitóticas espermatozoniais mostraram a ocorrência de cromossomos meta e submetacêntricos, sendo o cromossomo Y metacêntrico, sempre facilmente identificável devido ao seu tamanho extremamente pequeno (Fig. 5). Nas metáfases de três exemplares foram observadas falhas (*gaps*) cromossômicas, que correspondem a 20,41% das células analisadas, localizadas na região distal de alguns cromossomos (Fig. 6).

A análise de células meióticas mostrou a presença, na fase de diplóteno, de dez bivalentes autossômicos e de um trivalente sexual, sendo $2n=10II+X_1X_2Y$ (Fig. 7). Note-se que o Y, o menor do genoma, é bem saliente nesta figura, na qual a associação com os dois Xs (X_1 e X_2) ocorre pelos telômeros de um dos braços maiores de cada X com os telômeros dos dois braços – maior e menor – do Y. Na Fig. 8 é mostrada a interpretação da associação dos sexuais no trivalente.

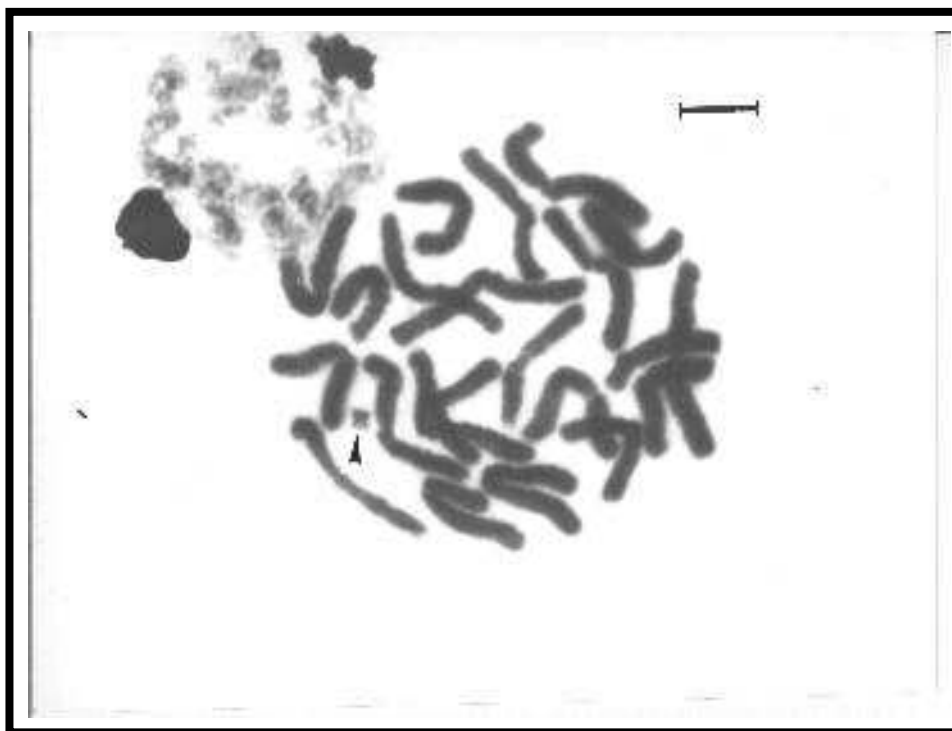


Figura 5 – Metáfase mitótica espermatogonial evidenciando a morfologia dos cromossomos dando um destaque maior para o cromossomo Y (seta). Barra=10 μ m.

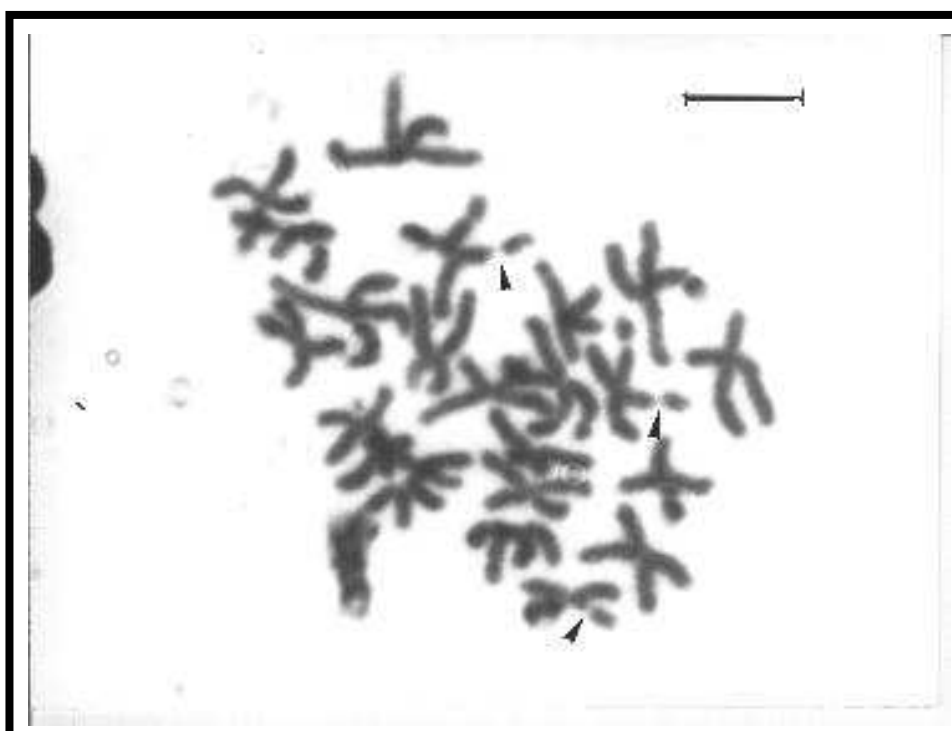


Figura 6 – Metáfase evidenciando as falhas cromossômicas (setas). Barra=10 μ m.

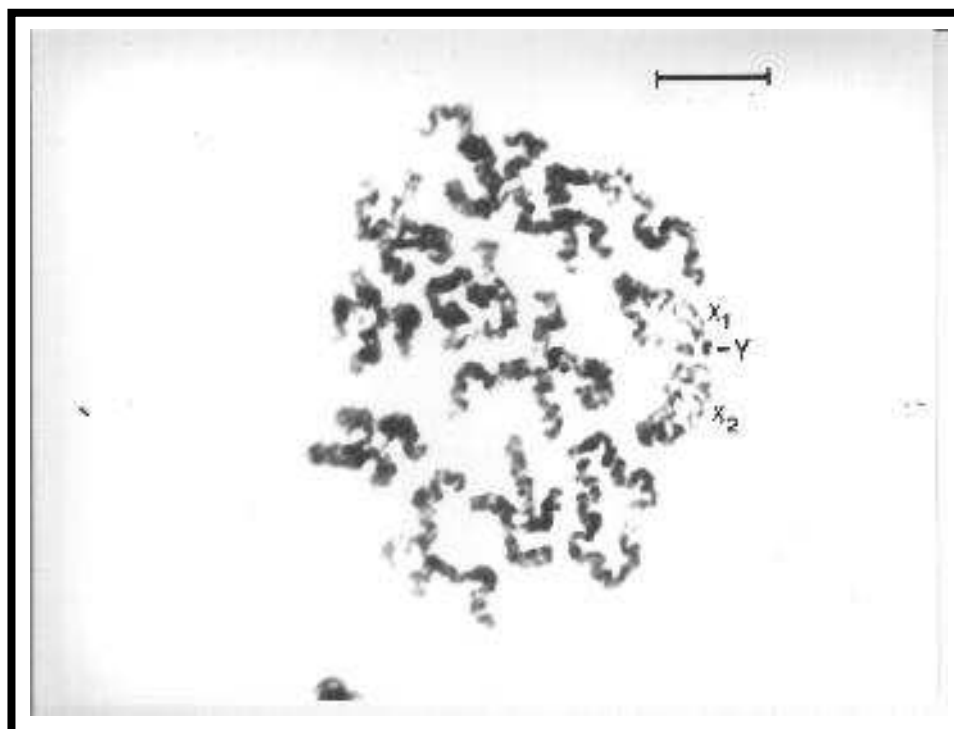


Figura 7 – Diplóteno evidenciando o trivalente sexual. Barra=10 μ m.

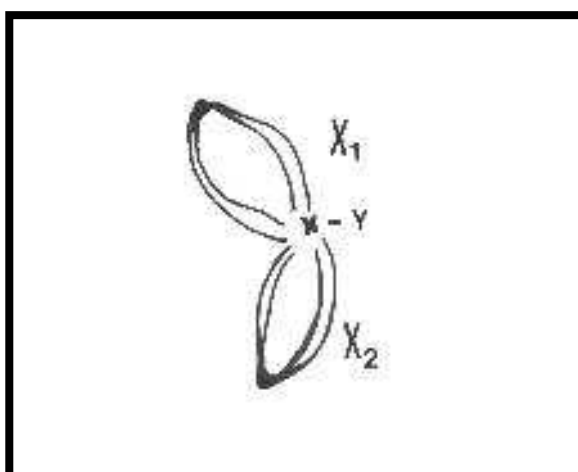


Figura 8 – Figura ilustrativa da interpretação da associação dos sexuais no trivalente.

4.1.2. Bandeamento C

A análise do material submetido à técnica de bandamento C, mostrou (em células mitóticas) um padrão pericentromérico, sendo proeminente em poucos cromossomos, incluindo os Xs (Fig. 9), o mesmo verificando-se em células meióticas (Fig. 10). Na figura 10, destacam-se a marcação pericentromérica tanto no X_1 como no X_2 e o Y que é totalmente heterocromático.

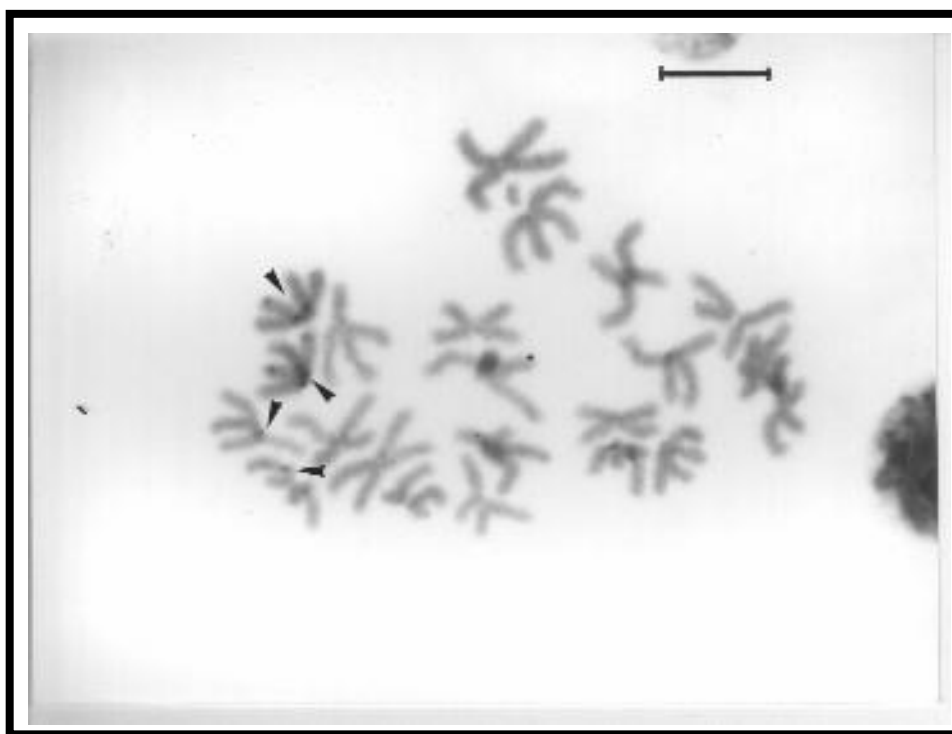


Figura 9 – Bandeamento C evidenciando marcações pericentroméricas em poucos cromossomos da metáfase. Barra=10 μ m.

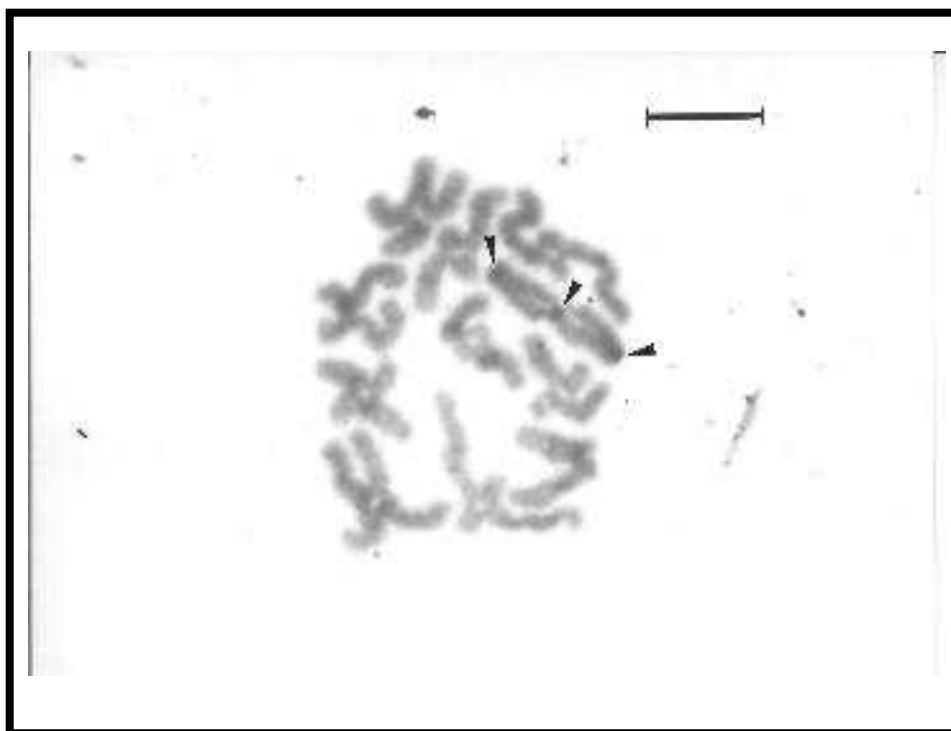


Figura 10 – Bandejamento C evidenciando marcações nos bivalentes e nos sexuais (setas) em uma célula diplotênica. O Y apresenta-se totalmente heterocromático (seta). Barra=10 μ m.

4.2. *Loxosceles laeta* Nicolet, 1849

A análise do material foi realizada em células espermatogoniais de exemplares adultos.

4.2.1. Coloração convencional

As metáfases mitóticas espermatogoniais mostraram a ocorrência de cromossomos meta e submetacêntricos, sendo o cromossomo Y metacêntrico, sempre facilmente identificável devido ao seu tamanho extremamente pequeno (Fig. 11). Em apenas um dos exemplares analisados foi possível verificar a presença de falha cromossômica e, a exemplo do que ocorreu em *L. intermedia*, está localizada na região distal de poucos cromossomos (Fig. 11). Esta alteração cromossômica foi observada em apenas um indivíduo e corresponde a 3,45% das células analisadas.

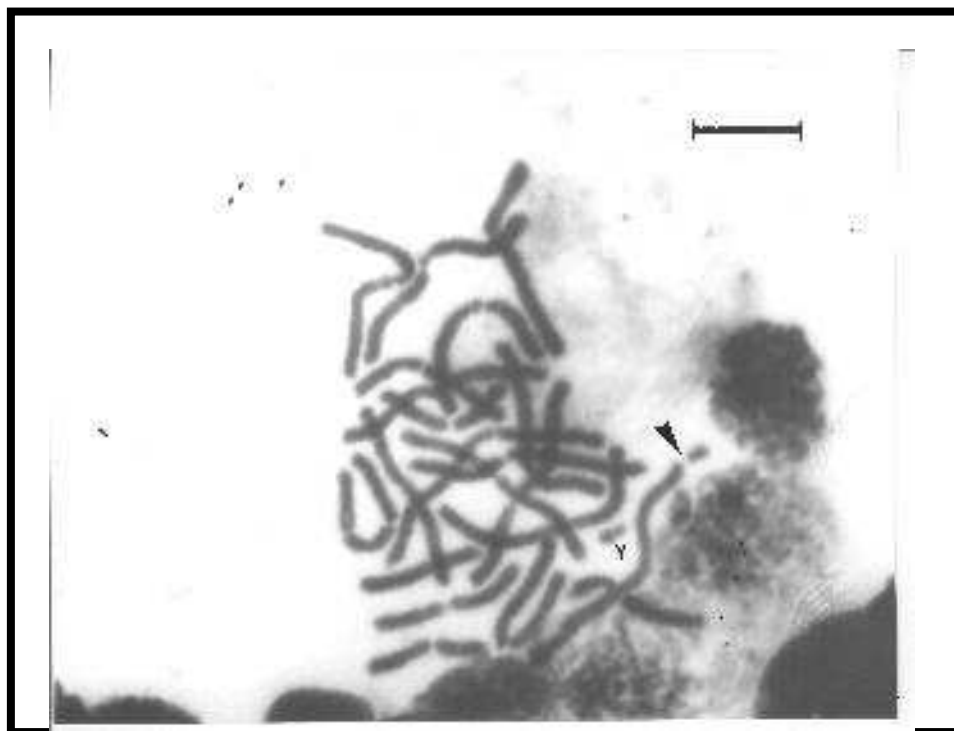


Figura 11 – Metáfase evidenciando falha cromossômica em um dos cromossomos autossomos (seta) e o cromossomo Y facilmente identificável devido ao seu tamanho reduzido. Barra=10 μ m.

A análise de células meióticas mostrou a presença, na fase de diplóteno, de dez bivalentes autossômicos e um trivalente sexual, sendo $2n=10II+X_1X_2Y$ (Fig. 12). Nesta figura, observa-se que a associação entre os cromossomos X_1 , X_2 e Y deu-se, à exemplo do que ocorreu em *L. intermedia*, pelas duas regiões teloméricas.

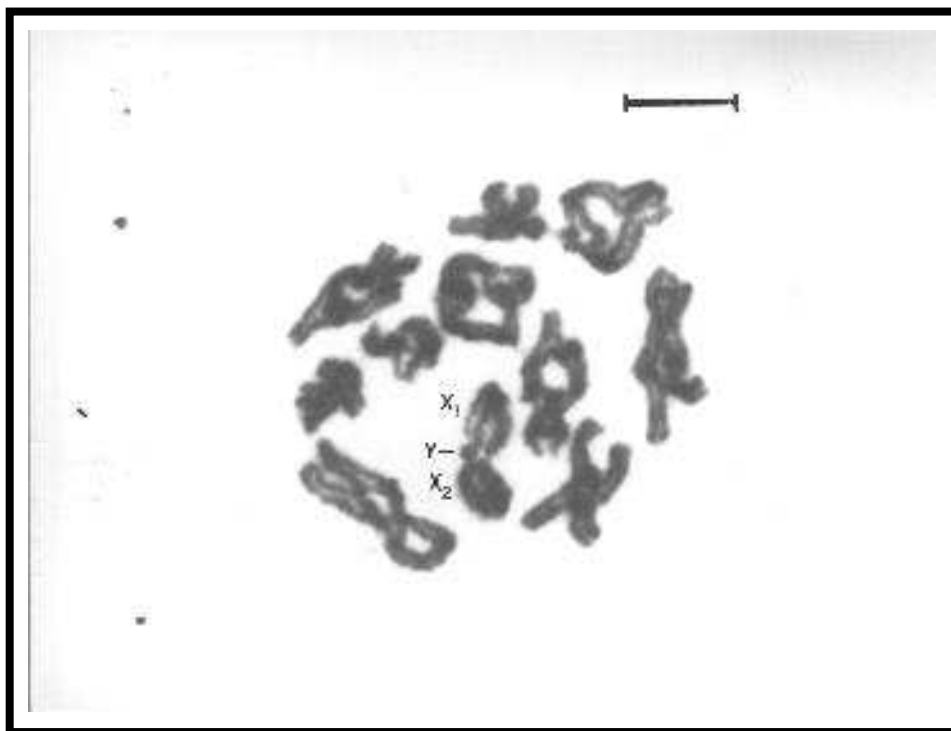


Figura 12 – Díploteno evidenciando o trivalente sexual. Barra=10µm.

4.2.2. Bandeamento C

A análise de células submetidas à técnica de bandeamento C, mostrou que nas metáfases mitóticas o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva apresentou-se pericentromérico em todos os cromossomos (autossomos e sexuais X_1 e X_2), sendo que o cromossomo Y se apresentou totalmente heterocromático (Fig. 13). O mesmo verificou-se nas células meióticas, com destaque para o Y que é todo marcado (Fig. 14).

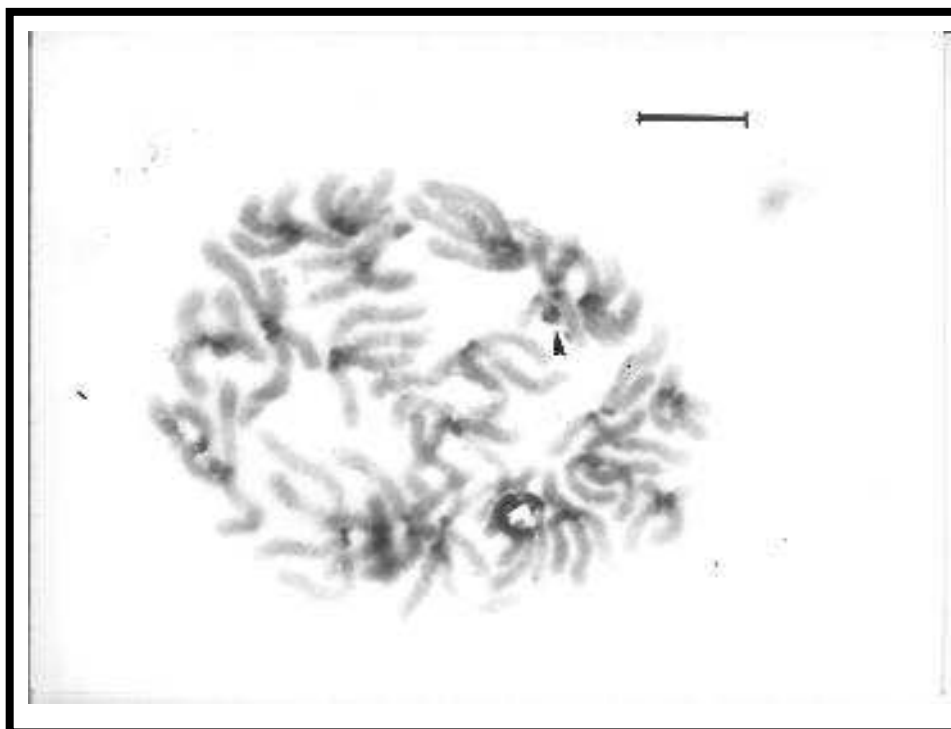


Figura 13 - Bandejamento C evidenciando marcações pericentroméricas em todos os cromossomos da metáfase. Na seta o cromossomo Y totalmente heterocromático. Barra=10 μ m.

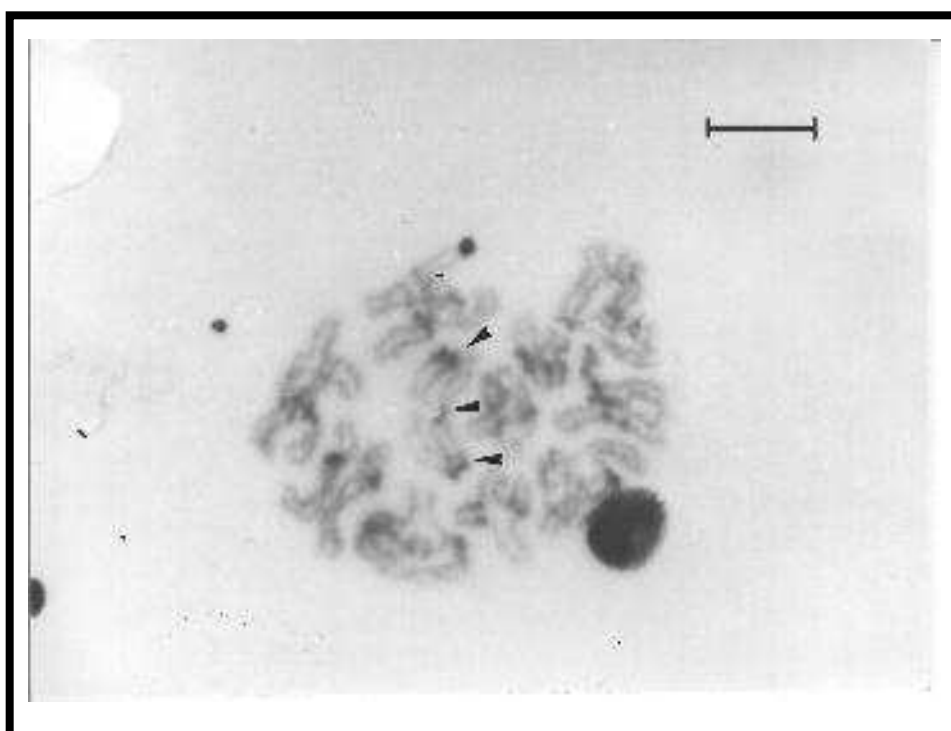


Figura 14 – Bandejamento C em uma célula diplotênica evidenciando marcações nos bivalentes e nos sexuais (setas). Barra=10 μ m.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo comparativo dos achados citogenéticos – mitóticos e meióticos; colorações convencional e bandeamento C – observados nas duas espécies estudadas neste trabalho.

Tabela 1: Resumo comparativo dos achados citogenéticos nas duas espécies

Taxa	2n	Coloração comum		Banda C	Meiose (Diplóteno)
		♂♂	♀♀		
<i>L. intermedia</i>	23/24	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 10 pares: M-SM ◆ 3 sexuais: X₁ e X₂= M-SM Y= M 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 10 pares: M-SM ◆ 4 sexuais: X₁ e X₂= M-SM 	Pericentromérica proeminente em poucos pares de autossomos, X ₁ e X ₂ ; Y todo marcado.	10 bivalentes autossômicos+ X ₁ X ₂ Y
<i>L. laeta</i>	23/24	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 10 pares: M-SM ◆ 3 sexuais: X₁ e X₂= M-SM Y=M 		Pericentromérica em todos os autossomos, X ₁ , X ₁ e X ₂ , X ₂ ; Y todo marcado.	

Legenda: M = metacêntrico, SM = submetacêntrico.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que as duas espécies – *L. laeta* e *L. intermedia* – apresentam 10 pares de autossomos meta – submetacêntricos e três cromossomos ímpares, os sexuais X_1 , X_2 e Y, igualmente com dois braços. Em ambas, o Y constituiu-se no menor cromossomo do conjunto. Em relação às fêmeas, obteve-se dados somente em *L. intermedia*, na qual verificou-se a presença de 12 pares homomórficos, incluindo os Xs ($X_1X_1X_2X_2$), todos meta – submetacêntricos, tal qual o observado no material dos machos. Em *L. laeta*, o sistema de determinação sexual foi inferido a partir do que foi observado nos machos, sendo idêntico ao descrito em *L. intermedia*. Nas células de alguns exemplares, de ambas espécies, foram observadas falhas cromossômicas (*gaps*), o que caracteriza alterações cromossômicas (aberrações) não esperadas. É possível que elas reflitam a ação de inseticidas, utilizados nos domicílios de origem desses exemplares, visando combatê-las bem como os insetos, seus alimentos preferidos. Neste sentido, tais inseticidas estariam agindo como agentes mutagênicos. Novas coletas, tanto em locais isentos da ação de inseticidas como em domicílios que o utilizam, são necessárias para se testar esta proposição.

O cariótipo destas duas espécies aqui descritas confirmam os relatos inicialmente propostos por SILVA (1988) e OLIVEIRA (1998), para *L. laeta* e por SBALQUEIRO et al., (1998) e OLIVEIRA (1990), para *L. intermedia*, exceto para o cariótipo das fêmeas de *L. intermedia* que é inédito.

Comparativamente, estes cariótipos mostram-se similares à *L. gaucho* no que diz respeito ao número diplóide e ao sistema de determinação sexual. Porém, em relação à morfologia dos cromossomos, esta espécie apresenta 2 pares de cromossomos acrocêntricos (OLIVEIRA et al., 1996; OLIVEIRA, 1998). Uma inversão pericêntrica parece ser o mecanismo responsável pela variação morfológica.

Com relação aos achados em outras espécies de *Loxosceles*, as diferenças são observadas quanto ao número de cromossomos: 18 (machos)/20 (fêmeas) em *L. reclusa* e ao sistema cromossômico múltiplo: X_1X_2 (machos)/ $X_1X_1X_2X_2$ (fêmeas), conforme TUGMON et al. (1990).

Segundo OLIVEIRA (1998), o sistema X_1X_2 pode ter dado origem ao X_1X_2Y através de fissão cêntrica envolvendo um cromossomo autossômico metacêntrico,

com subsequente fusão cêntrica de um dos braços deste elemento com o X_1 , originando o $NeoX_1$ e fusão cêntrica do outro braço deste mesmo cromossomo autossômico com o X_2 , originando o $NeoX_2$. O homólogo do cromossomo autossômico que sofreu fissão cêntrica, constituiria o $NeoY$, sendo seu tamanho reduzido explicado pela ocorrência de heterocromizações seguidas de deleções.

Tanto em *L. intermedia* quanto em *L. laeta*, foram observados dez bivalentes e um trivalente em células meióticas, confirmando o sistema cromossômico sexual múltiplo como sendo do tipo X_1X_2Y nos machos e $X_1X_1X_2X_2$ nas fêmeas. Estes dados coincidem com os achados de OLIVEIRA (1998) não só em relação às duas espécies como também para *L. gaucho*.

A presença de blocos heterocromáticos conspícuos em poucos cromossomos de *L. intermedia* e em todos os de *L. laeta* constitui-se em uma diferença citológica importante que poderá ser útil na identificação taxonômica do grupo. Com relação ao Y , em ambas este cromossomo é fortemente marcado. A morfologia idêntica – metacêntrica –, seu tamanho reduzido, associados ao padrão de bandeamento C, sugerem uma origem comum, ou seja, representam, possivelmente, um caráter sinapomórfico na história evolutiva destas duas espécies.

Os dados referentes ao padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva aqui apresentados são inéditos para o gênero tendo em vista o não relato destes achados na literatura. Seria interessante que a análise do bandeamento C fosse estendida às demais espécies do gênero, para verificar se há, de fato, uma diferenciação cariotípica entre as espécies, o que contribuiria à uma melhor caracterização taxonômica do grupo.

6. CONCLUSÕES

As duas espécies ocorrentes na região Metropolitana de Curitiba apresentam cariótipos similares, a nível de coloração comum, tanto em células somáticas como meióticas.

Em ambas, o número cromossômico é igual a 23 nos machos e 24 nas fêmeas, sendo que em *L. laeta* o 2n nas fêmeas foi inferido a partir dos dados dos machos. Os dados de fêmeas com 24 cromossomos em *L. intermedia* são inéditos.

As presenças de um trivalente em células meióticas (diplótenos) confirmam o sistema múltiplo de determinação sexual do tipo $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$, que é responsável pela diferenciação cromossômica numérica entre machos e fêmeas.

Estes dados compactuam com os provenientes da literatura pertinente, onde observa-se uma constância no número diplóide entre os machos ($2n=23$) bem como entre as fêmeas ($2n=24$), como conseqüência do sistema de determinação sexual de cromossomos múltiplos.

Em relação ao bandeamento C, que é inédito também para o gênero, se observou um padrão pericentromérico proeminente em poucos pares cromossômicos de *L. intermedia* e em todos os de *L. laeta*, exceto nos Ys de ambas que se mostraram totalmente heterocromáticos, o que constitui uma informação importante para a taxonomia destes taxa.

Portanto, os estudos citogenéticos em *Loxosceles* abrem a perspectiva de uma melhor caracterização específica dos táxons que o compõem. Com isso, outros estudos (biológicos, ecológicos, fisiológicos, comportamentais, entre outros) que estão sendo realizados com estas aranhas podem ser grandemente enriquecidos, em termos comparativos, pois não se tem certeza que os efeitos do veneno de todas as espécies estudadas sejam potencialmente iguais, causando o loxoscelismo tal como o conhecemos, ou se não o são, em que grau de importância se manifestam.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, R.D.; RUPPERT, E.E. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

BEÇAK, W.; BEÇAK, M.L. Constituição cromossômica de duas espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 4, n. 20, p. 425-427, 1960.

BRESCOVIT, A.D. **Araneae**. *In*: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Joly, C.A. & C.E.M. Bicudo (orgs.). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, SP. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/biodiv/sinopiniv.html>> Acesso em: 29 jun. 2001.

BÜCHERL, W. A aranha *Loxosceles* e “Loxoscelismo”. **Cienc. Cult.** (São Paulo). v. 12, n. 2, p. 84-85, 1960.

CADERNOS DE SAÚDE - Secretaria Municipal da Saúde de Curitiba. **Loxosceles: “A Aranha Marrom”**. n. 2. Curitiba, 1993.

DIAZ, M.; SAÉZ, F. Investigaciones citogeneticas sobre algunas espécies de aracnidos uruguayos. **An. II Cong. Lat. Am. Zoo.** (São Paulo) n. 2, p. 3-9, 1965.

DIAZ, M.; SAÉZ, F. Karyotypes of South-American Araneida. **Mem. Inst. Butantan**, v. 1, n. 33, p. 153-154, 1966.

FISCHER, M.L. **Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* MELLO-LEITÃO, 1934, (ARANEAE, SICARIIDAE), no Município de Curitiba, PR**. Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). **Bull. Am. Mus. Ant. Hist.** V. 136, n. 3, p. 117-174, 1967.

OLIVEIRA, E.G. **Estudo Citogenético em 13 espécies de aranhas (ARACHNIDA, ARANEAE) pertencentes às famílias Ctenidae, Lycosidae, Sicariidae e Theraphosidae.** Rio Claro, 1998. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

OLIVEIRA, E.G.; CELLA, D.M.; BRESCOVITT, A.D.; BERTIN, C.R. The karyotype of *Loxosceles gaucho* and *Ctenus ornatus* (Archnida, Araneae, Loxoscelidae, Ctenidae). **Braz. J. Genet.** v. 19 (3) : 128 (supl.), 1996.

RIBEIRO, A.; von EICKSTEDT, M.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* (Heineken & Lowe), **Relat. Inst. Butantan**, São Paulo, 1991.

SANTOS FILHO, J.F. Avaliação dos efeitos do veneno da aranha marrom sobre a matriz extracelular. In: VIII EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPR (2000 : Curitiba). **Anais do VIII Evento de Iniciação Científica da UFPR.** Curitiba : UFPR, Editora UFPR, 2000. p. 65.

SBALQUEIRO, I.J.; LINZING, S.; MANGILI, O.C.; KLISIEWICZ, D.R. Sistema cromossômico múltiplo de determinação sexual do tipo $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ em *Loxosceles intermedia* (Araneae: Loxoscelidae). Cad. Res. da 50^a Reunião Anual da SBPC, **Ciênc. e Cult.** (supl.), p. 1217-1218, 1998.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 31 (6): 403-415, 1989.

SILVA, D.D. Estudio cariotipico de *Loxosceles laeta* (Araneae: Loxoscelidae). **Rev. Per. Ent.**, 31, p. 9-12, 1988.

SOUZA, G.A. de; RIBEIRO, A.S.; SANTOS, V.L.P.; VEIGA, S.S.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Proteolytic effect of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom

proteins on EHS-basement membrane structures. **Acta Biol. Par.**, Curitiba, 27 (1-4):97-109, 1998.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, 75: 304-6. 1972.

TUGMON, C.R.; BROW, J.D.; HORNER, N.V. Karyotype USA spider (Araneae, Araneidae, Gnaphosidae, Loxoscelidae, Lycosidae, Oxyopidae, Philodromidae, Salticidae and Theridiidae). **J. Arachnol.** n. 18, p. 41-48, 1990.

WEBB, G.C.; WHITE, M.J.D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formerly *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosome banding studies. **Chromosoma**, v. 67, p. 309-39, 1978.

WHITE, M.J.D. **Animal Cytology and Evolution**. 3. Ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1973. 961p.