



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO TOCANTINS
CAMPUS ARAGUATINS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CIDILEIA FIRMINO DE SOUZA

**COLORAÇÃO CONVENCIONAL, BANDAMENTO C E AgRON EM
CROMOSSOMOS DE *Pholcus phalangioides* (ARANEOMORPHAE,
PHOLCIDAE) DO EXTREMO NORTE DO TOCANTINS**

ARAGUATINS -TO

2017

CIDILEIA FIRMINO DE SOUZA

**COLORAÇÃO CONVENCIONAL, BANDAMENTO C E AgRON EM
CROMOSSOMOS DE *Pholcus phalangioides* (ARANEOMORPHAE,
PHOLCIDAE) DO EXTREMO NORTE DO TOCANTINS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência
e Tecnologia do Tocantins - *Campus* Araguatins
como exigência à obtenção do grau de Licenciada do
Curso Superior em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Josafá Carvalho Aguiar

Coorientadora: Profa. Dra. Rosângela Martins de
Oliveira

**ARAGUATINS – TO
2017**

Souza, Cidileia Firmino

Coloração convencional, bandamento C e AgRON em cromossomos de *Pholcus phalangioides* (Araneomorphae, Pholcidae) do extremo norte do Tocantins/Cidileia Firmino de Souza. – Araguatins - Tocantins, 2017.
55 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Campus Araguatins, 2017.

Orientador(a): Prof. Dr. Josafá Carvalho Aguiar
Coorientador(a): Rosângela Martins de Oliveira

1. Pholcidae 2. *Pholcus phalangioides* 3.número diploide 4.cromatina sexual, 5.meiose.

*TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO TOCANTINS
CAMPUS ARAGUATINS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

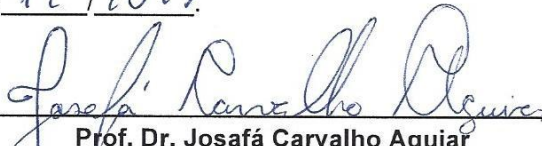
TÍTULO: "COLORAÇÃO CONVENCIONAL, BANDAMENTO C E AgRON EM CROMOSSOMOS DE *Pholcus phalangioides* (Araneomorphae, Pholcidae) DO EXTREMO NORTE DO TOCANTINS"

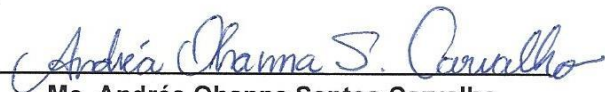
AUTOR: CIDILEIA FIRMINO DE SOUZA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josafá Carvalho Aguiar

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, *Campus* Araguatins, como parte das exigências para a conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado (a) em 15 / 12 / 2017.


Prof. Dr. Josafá Carvalho Aguiar
Instituto Federal do Tocantins – IFTO, *Campus* Araguatins


Me. Andréa Ohanna Santos Carvalho
Instituto Federal do Tocantins – IFTO, *Campus* Araguatins


Prof. Me. Francisco Vieira
Instituto Federal do Tocantins – IFTO, *Campus* Araguatins

À Deus por ter me dado força e coragem para ultrapassar e vencer todos os obstáculos, aos meus filhos Claudiléia Souza, Vittor Matheus Firmino e Clair Firmino, que são minha maior inspiração e motivação e a todos meus familiares, mãe, pai (*in memóriam*), meus irmãos, irmãs e sobrinhos pela colaboração e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde, paz, por está comigo em todos os momentos e por ter me permitido chegar até aqui.

À minha mãezinha, Judite Firmino e ao meu querido Pai Eurípedes (*in memóriam*), pelo amor, carinho, incentivo, conselhos, motivação e por sempre se fazerem presentes em minha vida.

Aos meus filhos Claudiléia Souza, Vittor Mateus e Clair Firmino, por existirem em minha vida e por serem o motivo de toda minha força, persistência, amor e dedicação.

Ao Dr. João Vieira, por ter me ajudado moralmente e financeiramente, pelo incentivo, carinho e apoio mesmo com tantas restrições e dificuldades.

Às minhas queridas e estimáveis irmãs Ivanilde Firmino e Elaine Firmino, pela linda amizade, carinho e cooperação.

Aos meus queridos irmãos Givanildo Firmino e Josiel Firmino, que sempre me incentivaram com seus carinhos e palavras de motivação; sei que mesmo longe posso sempre contar com vocês.

À todos meus familiares, amigos e colegas de graduação que me apoiaram direta ou indiretamente nessa caminhada acadêmica.

À todos meus professores da Educação Básica e principalmente do Ensino Superior, pelos ensinamentos e contribuição de cada um na minha formação.

Ao IFTO – *Campus Araguatins*, por tornar real meu sonho de graduação.

À minha orientadora/coorientadora Rosângela Martins de Oliveira, pela paciência, conhecimentos, oportunidades, dedicação e pelos valiosos conselhos que me deste, por acreditar em mim e a sua grande ajuda ao longo desse trabalho.

Ao professor Doutor Josafá Carvalho por ter aceitado esse desafio e por fazer parte da minha banca avaliadora.

À todos, meus sinceros agradecimentos!

A estrada da vida pode ser longa e áspere. Faça-a mais suave, caminhando e cantando com as mãos cheias de boas sementes.

Cora Coralina

RESUMO

A família Pholcidae é a segunda maior dentro da infraordem Araneomorphae e as aranhas que as pertencem são conhecidas como aranhas-de-pernas-longas, treme-treme ou aranhas de cavernas. Levando em consideração a escassez de estudos citogenéticos em representantes que ocorrem no Brasil, o objetivo desse trabalho foi caracterizar cromossomicamente indivíduos da espécie *Pholcus phalangioides* encontrados no extremo norte do Tocantins. Citogeneticamente, os números diploides encontrados em células de indivíduos machos e de fêmeas de Pholcides variaram interespecificamente de $2n=15$ a $2n=32$ cromossomos, com morfologia cromossômica metacêntrica ou submetacêntrica. Os sistemas de cromossomos sexuais (SCS) encontrados em Pholcides foram XO/XX, XX/XY, $X_1X_2/X_1X_1X_2X_2$ e $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$. No presente trabalho foram analisados um total de 94 exemplares, sendo 48 machos, 46 fêmeas e 09 embriões de *P. phalangioides*, utilizando coloração convencional Giemsa, bandamento C e impregnação pela prata (AgRON). O número diploide encontrado na referida espécie foi de $2n=23$ em machos e $2n=24$ em fêmeas com cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos. Os resultados alcançados se integram ao padrão cariotípico da família Pholcidae. As análises de metáfases oogoniais e espermatogoniais permitiram inferir que o sistema cromossômico sexual da população de *P. phalangioides* estudada é XO/XX. A técnica de bandamento C, mostrou um padrão heteropicnótico que ocorreram nas regiões teloméricas e centroméricas nos cromossomos em metáfases mitóticas de machos de *P. phalangioides*, o que está de acordo para a família. Em núcleos interfásicos foram observados blocos heteropicnóticos positivos, sugerindo assim, a presença de cromatina sexual. A impregnação pela prata evidenciou as regiões organizadoras de nucléolos em mais de um par de autossomos em células de indivíduos machos. Os dados obtidos neste trabalho reforçam a ampla variabilidade de número diploide e morfologia cromossômica existentes na família Pholcidae.

Palavras-chave: Pholcidae, *Pholcus phalangioides*, número diploide, cromatina sexual, meiose.

ABSTRACT

The Pholcidae family is the second largest within the Araneomorphae infraorder and the spiders that belong to them are known as long-legged spiders, treme-treme or cave spiders. Taking into account the scarcity of cytogenetic studies in representatives that occur in Brazil, the objective of this work was to characterize chromosomally individuals of the species *Pholcus phalangioides* found in the extreme north of Tocantins. Cytogenetically, the diploid numbers found in cells of both male and female Pholcides were interspecifically ranging from $2n = 15$ to $2n = 32$ chromosomes, with metacentric or submetacentric chromosome morphology. The sex chromosome systems (SCS) found in Pholcides were XO / XX, XX / XY, $X_1X_2 / X_1X_1X_2X_2$ and $X_1X_2Y / X_1X_1X_2X_2$. In the present work, a total of 94 specimens were analyzed, being 48 males, 46 females and 09 *P. phalangioides* embryos, using conventional Giemsa staining, C banding and silver impregnation (AgRON). The diploid number found in this species was $2n = 23$ in males and $2n = 24$ in females with metacentric or submetacentric chromosomes. The results obtained are integrated to the karyotype pattern of the Pholcidae family. The analysis of oogonia and spermatogonia metaphases allowed us to infer that the sex chromosomal system of the population of *P. phalangioides* studied is XO / XX. The C-banding technique showed a heteropicnotic pattern that occurred in the telomeric and centromeric regions on the chromosomes in mitotic metaphases of *P. phalangioides* males, which is in agreement with the family. Positive heteropicnotic blocks were observed in interphase nuclei, thus suggesting the presence of sex chromatin. Impregnation by silver evidenced the nucleolar organizing regions in more than a pair of autosomes in cells of male subjects. The data obtained in this work reinforce the wide variability of diploid number and chromosome morphology in the Pholcidae family.

Keywords: Pholcidae, *Pholcus phalangioides*, diploid number, sexual chromatin, meiosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Ilustração relacionando o parentesco entre as duas subordens, Mesothelae e o grupo mais basal e Opisthothelae, o grupo mais derivado.....16
- Figura 2:** Distribuição geográfica da família Pholcidae 18
- Figura 3:** Exemplares estudados citogeneticamente. **a.** Aranha macho destacando suas quelíceras. **b.** Aranha fêmea carregando seus filhotes (Ooteca) e **c.** Embriões de *P. phalangioides* em fase bem desenvolvida..... 30
- Figura 4:** Cromossomos mitóticos de macho. **a.** Cariótipo com $2n=23$ cromossomos. **b.** Célula em metáfase mitótica na qual se obteve o cariótipo mostrado na figura **a** 35
- Figura 5:** Cromossomos mitóticos de fêmea de *P. phalangioides*. **a.** Cariótipo com $2n=24$ cromossomos. **b.** Célula em metáfase mitótica na qual se obteve o cariótipo mostrado na figura **a**.....36
- Figura 6:** Cromossomos em metáfase mitótica encontrados em fêmeas de *P. phalangioides*. Respectivamente, corados com Giemsa. Contendo número diploide igual ($2n=24=22 + XX$) em todas as células. Setas mostram o cromossomo sexual X..... 36
- Figura 7:** Cromossomos de embriões de *P. phalangioides* em diferentes estágios de desenvolvimento. Corados com Giemsa. **a e b.** Paquítenos em fase final. **c, d, e, f.** Metáfases mitóticas. Setas indicam cromossomos empilhados 37
- Figura 8:** Núcleos interfásicos de machos de *P. phalangioides*. **a.** Corado com Giemsa; **b.** Corado através da técnica de bandamento C e **c.** Corados através da impregnação pelo íon prata (AgRON). Setas indicam os núcleos heteropicnóticos positivos. 38

Figura 9: Núcleos interfásicos de fêmea de *P. phalangioides*. **a, b e c.** Corados convencionalmente com Giemsa. Setas indicam os núcleos heteropicnóticos positivos. 38

Figura 10: Células diplotênicas de exemplares machos de *P. phalangioides*. **a, b e c.** Metáfases II, coradas com Giemsa, mostrando números haploides de $2n=11$ cada uma. **d, e e f.** Metáfases II, mostrando números haploides de $2n=12 = 11A + X$. Setas indicando o cromossomo sexual X.....39

Figura 11: Células diplotênicas de exemplares machos de *P. phalangioides*. **a.** Paquíteno corado com Giemsa. **b.** Células no final da fase de paquíteno e entrando diplóteno coradas com Giemsa. **c.** Paquíteno corado através da técnica de bandamento C e **d.** Células em paquíteno coradas através da impregnação pelo íon prata (AgRON). Setas indicam blocos heteropicnóticos positivos. 40

Figura 12: Cromossomos de *P. phalangioides* macho, corados através da técnica de bandamento C e com $2n=12$. **a.** Metáfase espermatogonial. **b.** Metáfase II. **c.** Metáfase espermatogonial. **d.** Metáfase espermatogonial. **e.** Metáfase II. **f.** Metáfase espermatogonial. Setas (fig. **c**) indicam autossomo com quatro marcações longitudinais para a distribuição da heterocromatina constitutiva e marcações dos telômeros e centrômeros dos autossomos.....41

Figura 13: Cromossomos de *P. phalangioides* machos, corados através da técnica de AgRON. Cromossomos de um indivíduo macho mostrando as AgRON. **a.** Metáfase espermatogonial. **b.** Metáfase mitótica. **c.** Metáfase espermatogonial com $2n=15$. **d.** Metáfase espermatogonial com $2n=17$. **e.** Metáfase espermatogonial e **f.** Metáfase II com $2n=13$. Setas indicam cromossomos portadores de rons. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados cromossômicos da família Pholcidae. **Citada como** = nome da espécie adotado pelo autor que realizou a análise citogenética; **2n** = número diploide em indivíduos machos, **SCDS** = sistema cromossômico de determinação sexual; **T** = telocêntrico; **A** = acrocêntrico; **Sm** = submetacêntrico; **M** = metacêntrico 26

Tabela 2. Relação do número de aranhas coletadas, família, espécime, sexo e local de coleta dos indivíduos analisados citogeneticamente..... 28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Histograma representativo das frequências dos números diploides encontrados nos indivíduos machos de *P. phalangioides* 34

Gráfico 2. Histograma representativo das frequências dos números diploides encontrados em aranhas fêmeas de *P. phalangioides* 35

Gráfico 3. Histograma representativo das frequências dos números haploides encontrados em machos de *P. phalangioides* 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA ou ADN – Ácido Desoxirribonucleico

A – Acrocêntrico

AgRON – Região Organizadora de Nucléolo marcada pela prata

E.P.I – Equipamento de Proteção Individual

P. phalangioides – *Pholcus phalangioides*

SCS – Sistema Cromossômico Sexual

RON – Região Organizadora de Nucléolo

M – Metacêntrico

Sm – Submetacêntrico

H – Holocêntrico

St – Subtelocêntrico

SSC – *Saline Sodium Citrate*

RNA ou ARN – Ácido ribonucleico

2n – Número diploide

n – Número haploide

T – Telocêntrico

SCDS – Sistema Cromossômico de Determinação Sexual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Considerações gerais sobre as aranhas	15
2.1.1 Características morfológicas da infraordem Araneomorphae	15
2.1.2 Aspectos gerais da família Pholcidae	17
2.2 Citogenética de Aranhas	21
2.2.1 Histórico sobre a citogenética de aranhas.....	21
2.2.2 Bandamento C	23
2.2.3 Regiões Organizadoras de Nucléolos	24
2.2.4 Estudos Citogenéticos na família Pholcidae	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material.....	28
3.1.1 Descrição da coleta do material	28
3.1.2 Análise dos cariótipos.....	30
3.1.3 Montagem do cariótipo	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Obtenção dos cromossomos meióticos e mitóticos, segundo Araujo et al. (2007).....	31
3.2.2 Preparação das lâminas	32
3.2.3 Coloração Convencional (Giemsa).....	32
3.2.4 Técnica de Bandamento C	32
3.2.5 Técnica de AgRON (Região Organizadora de Nucléolo marcada pelo Íon prata)	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Resultados.....	34

4.1.1 Coloração convencional Giemsa em <i>P. phalangioides</i>	34
4.1.2 Bandamento C de <i>P. phalangioides</i>	41
4.1.3 Região Organizadora de Nucléolo em <i>P. phalangioides</i>	43
4.2 Discussão	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

As aranhas pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Araneae. Essa ordem é a segunda mais diversa dentre os aracnídeos e está dividida em 114 famílias, 3.972 gêneros e 45.738 espécies já descritas (PLATNICK, 2014; WORLD SPIDER CATALOG, 2016).

A ordem Araneae está dividida em duas subordens: Mesothelae e Opisthothelae. A primeira são as aranhas que possui um abdômen segmentado. Já a segunda subordem é dividida em duas infraordens: Mygalomorphae que incluem todas as caranguejeiras e Araneomorphae apresentam mais de 90% de todas as outras aranhas existentes (DUTRA, 2006; FOELIX, 1996). A infraordem Araneomorphae é cosmopolita e dentre essa, encontra-se, entre outras, a família Pholcidae, cujos representantes são conhecidos popularmente no Brasil como aranhas de pernas longas (ZHANG et al., 2006).

O Brasil é o país com maior diversidade de aranhas do mundo, com cerca de 3.203 espécies descritas, com distribuição em 72 famílias. Entretanto, no estado do Tocantins, os estudos citogenéticos sobre esses aracnídeos praticamente inexistem (BRESCOVIT et al., 2011).

A ordem Araneae necessita de mais estudos que caracterizem suas espécies, principalmente na região Neotropical. A parte central do Brasil é uma das mais negligenciadas quanto à identificação de sua fauna de aracnídeos, incluindo as aranhas. As análises citogenéticas, que deveriam contribuir para a caracterização das aranhas, em especial as pertencentes à subordem Araneomorphae, família Pholcidae e espécie *Pholcus phalangioides*, são ainda mais raras. No contexto cromossômico, apenas 19 espécies foram cariotipadas na família Phocidae (GOLDING e PALIULIS, 2011; ARUNKUMAR e JAYAPRAKASH, 2015).

Os números diploides encontrados na família Pholcidae variaram de $2n=15$ a $2n=32$, e a morfologia predominante foi de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Os tipos de Sistemas Cromossômicos Sexuais (SCS) encontrados foram: XO/XX, XX/XY, $X_1X_2/X_1X_1X_2X_2$ e $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ (BOLEGOWDA, 1958; SRIVASTAVA e SHUKLA, 1986; SHARMA e PARIDA, 1987; KRÁL

et al., 2006; ARAUJO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; GOLDING e PALIULUS, 2011; ARUNKUMAR e JAYAPRAKASH, 2015).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONS), identificadas pela técnica de impregnação pela prata, foram observadas em até quatro cromossomos de diferentes espécies de Pholcides, inclusive em cromossomos sexuais (ARAUJO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; ARUNKUMAR e JAYAPRAKASH, 2015).

Considerando a escassez de estudos em torno das características cromossômicas básicas dentro do grupo das Araneomorphae e da família Pholcidae, o objetivo deste trabalho foi estudar citogeneticamente a espécie *P. phalangioides* utilizando as técnicas citogenéticas (coloração Giemsa, bandamento C e coloração com nitrato de prata), através da análise cromossômica de células mitóticas e meióticas extraídas gônadas de (testículos, ovários e embriões), para definir as principais características cromossômicas da referida espécie coletada no município de Araguatins, situada no extremo norte do Tocantins.

Para a caracterização citogenética, os exemplares coletados tiveram seus cariótipos estudados e comparados com outros indivíduos já estudados da família Pholcidae. Esse estudo pode contribuir para o entendimento da evolução cromossômica da mesma e, fornecer informações para a taxonomia da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre as aranhas

2.1.1 Características morfológicas da infraordem Araneomorphae

Dentro da ordem Araneae, as aranhas são os animais com mais facilidade de serem reconhecidos pelo homem. De modo geral, assim como os demais aracnídeos, as aranhas possuem o corpo dividido em cefalotórax (prossoma), e abdômen (opistossoma), um par de palpos, quatro pares de pernas locomotoras e um par de quelíceras. Sendo assim, esses pequenos animais possui uma série de características exclusivas, tais como: separação entre o cefalotórax e o abdômen por um fino pedicelo, presença de glândulas produtoras de toxina, a qual é inclusa dentro das quelíceras e de glândulas produtoras de seda, localizadas dentro das fiandeiras (BRESOVIT, 2003; GIMENEZ-PINHEIRO, 2015).

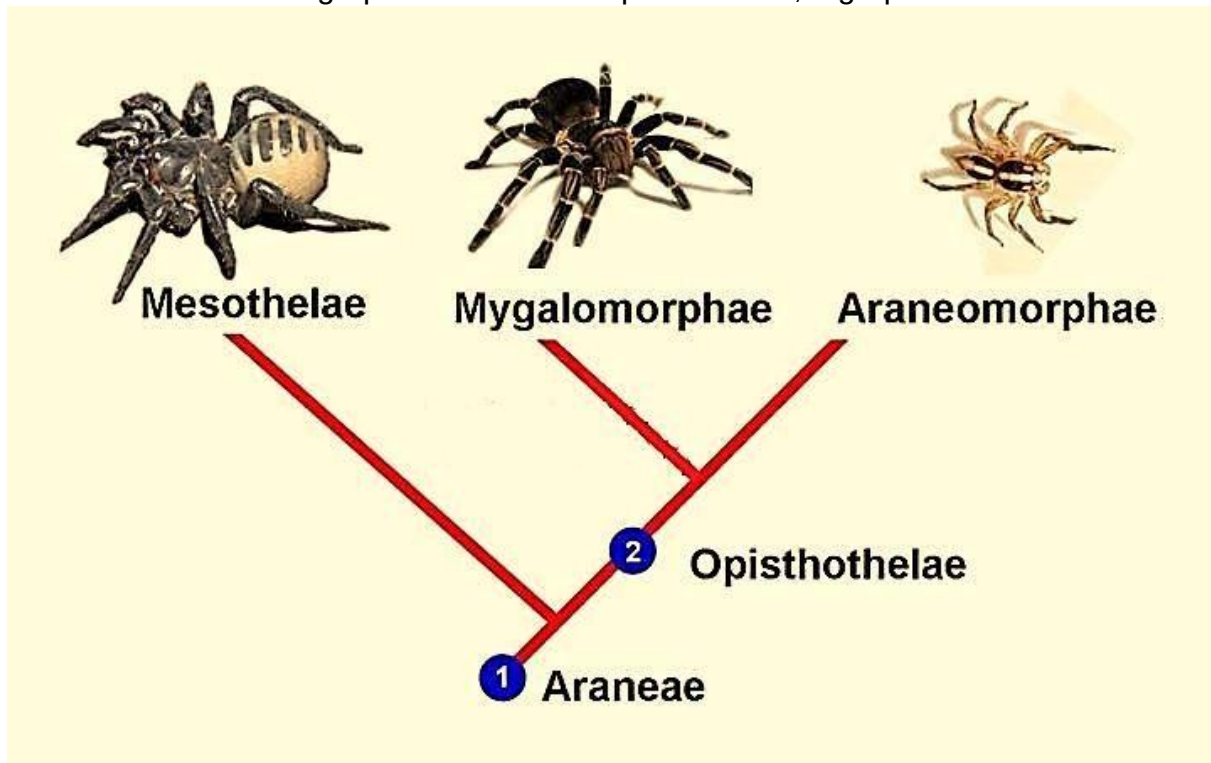
A infraordem das Araneomorphae é composta por 95 famílias, 3.500 gêneros e 41.000 espécies (CODDINGTON e LEVI, 1991; PLATNICK, 2013). Nesse táxon encontram-se as aranhas conhecidas comumente como aranhas verdadeiras, aranha de pernas longas, aranha treme-treme, aranha das cavernas e estão distribuídas em quase todas as regiões biogeográficas (FUESSLIM, 1975).

No Brasil existe cerca de 60 famílias de Araneomorphae já registradas e as seis principais famílias com maior número de espécies são: Araneidae com 25 espécies, Theridiidae com 19, Nemesiidae e Anyphaenidae com 10, Ctenidae com 9 e Corinnidae com 8 espécies. Em geral, as duas primeiras famílias citadas estão entre as que sempre apresentam maior abundância nos inventários araneológicos, conforme Silva (1996) e Bonaldo et al., (2009), para dados sobre a região Amazônica e para a Mata Atlântica (BRESOVIT et al., 2004; MOREIRA, 2006; INDICATTI e BRESOVIT, 2008; INDICATTI et al., 2012).

A ordem Araneae está dividida em duas subordens: Mesothelae e Opisthothelae (DUTRA, 2006). A primeira subordem está inclusa as aranhas com abdômen pseudosegmentado, possuidoras de características menos derivados, e de distribuição geográfica situada na Ásia (nas regiões Paleárticas e Ocidentais),

possuindo 96 espécies reunidas em 08 gêneros pertencendo a uma única família: Liphistiidae (WORLD SPIDER CATALOG, 2016). Já a subordem Opisthothelae é dividida em duas infraordens: Araneomorphae e Mygalomorphae. A figura 1 demonstra a filogenia dessas subordens.

Figura 1. Ilustração relacionando o parentesco entre as duas subordens, Mesothelae e o grupo mais basal e Opisthothelae, o grupo mais derivado.



Fonte: BRAZIL, (2009).

Os integrantes da infraordem das Araneomorphae são caracterizados por possuírem quelíceras opostas uma a outra (Labidognatha), que funcionam no sentido externo-interno e, por isso, são chamadas quelíceras diaxiais (2 eixos), diferentes das Mygalomorphae que suas quelíceras estão orientadas para cima e para baixo (THALER e KNOFLACH, 2004; GIMENEZ-PINHEIRO, 2015).

Essas aranhas formam um dos grupos zoológicos de grande importância, pelo elevado número de espécies e grande poder de adaptação a diversos ambientes (importância ecológica), pela aplicação do fio da seda por elas produzido em instrumentos ópticos e hemostáticos (importância econômica) e pelos acidentes

que podem provocar em seres humanos e animais domésticos (importância médica). Existem diversos trabalhos que estudam as toxinas desses aracnídeos visando desenvolver antibacterianos e bioinseticidas (MORTARI, 2007).

Sob o ponto de vista citogenético as Araneomorphae constituem um grupo de animais poucos estudados e somente cerca de 51 espécies de todas as Araneomorphae foram cariotipadas (ARAUJO, 2007). O número diploide variou de $2n=29$ para a família Hypochilidae e espécie *Hypochilus pococki* e $2n=38$ na família Austrochilidae e *Austrochilus* sp. A morfologia cromossômica descrita para esta infraordem foi: cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (Sm), acrocêntricos (A), holocêntrico (H) e subtelocêntricos (St). Nas Araneomorphae ocorrem sistemas de determinação sexual simples, como: X; X_1X_2Y ; e sistemas múltiplos, tais como: X_1X_2 , X_1X_2Y . A determinação desses sistemas sexuais só foi possível com a utilização de colorações diferenciadas, tais como: coloração com Giemsa, bandamento C e coloração com nitrato de prata, em células mitóticas e meióticas (PAULA NETO, 2013).

Para essa infraordem as colorações diferenciadas (bandamento C e AgRON) são pouco utilizadas. O bandamento C nos cromossomos desses indivíduos encontram-se na região centroméricas e telomérica. A região organizadora de nucléolos foi descrita para a região terminal de cromossomos autossômicos, na região centromérica e pericentromérica.

2.1.2 Aspectos gerais da família Pholcidae

A família Pholcidae é cosmopolita, pois seus representantes são encontrados em quase todas as regiões biogeográficas. São bastante conhecidas, por serem facilmente encontradas em zona urbana (ZHANG et al., 2006). A espécie *P. phalangoides* faz parte dessa família e são naturalmente encontradas em moradias e outras construções que tenham locais sombrios e abrigos para elas (PLATNICK, 2014).

O Brasil possui hoje cerca de 3.203 espécies de aranhas, distribuídas em 72 famílias, deste modo, é um dos países com maior diversidade de aranhas do mundo. A família Pholcidae é a maior entre as Araneomorphae, sendo responsável

por grande parte de toda a diversidade da infraordem (WORLD SPIDER CATALOG, 2016). São encontradas em todos os continentes exceto na Antártida e nas regiões polares do hemisfério norte, locais muito frios e que não permite a sua sobrevivência, como demonstra na figura 2.

Figura 2. Distribuição geográfica da família Pholcidae



Fonte: WORLD SPIDER CATALOG, (2016).

As aranhas pertencentes à família Pholcidae são predadoras insetívoras que se alimenta de pequenos insetos que caem em sua teia, porém, existem algumas espécies dessa família que além de insetos, também se alimentam de outras aranhas, atacando suas teias e devorando os espécimes presentes no local, incluindo seus ovos. As aranhas Pholcidae apresentam tamanhos variados, sendo de pequeno e médio porte, seu corpo mede entre 2 a 10 mm, incluindo as pernas em algumas espécies, pode chegar até 50 mm (FOELIX, 2011).

A família Pholcidae Possui um padrão de coloração que vai do cinza ao castanho, com presença de listas, pintas ou manchas coloridas (FOELIX, 2011). A família inclui espécies com seis e com oito olhos, organizados em números pares localizados na frente do cefalotórax. As espécies associadas a esta família são

consideradas inofensivas para os humanos (BARTH, 2002; FOELIX, 2011). Apesar de algumas espécies de aranhas pertencentes a outras famílias, possuírem quelíceras forte o suficiente para penetrar a pele humana e injetar seu veneno, as quelíceras das aranhas da família Pholcidae, são de tamanho pequeno e seus ferrões são curtos ou fracos demais para atravessar a pele humana na hora de uma eventual picada (FOELIX, 2011; KUHN-NENTWIG et al., 2011; NENTWIG, 2013).

Apesar do grande número de espécies pertencentes à família Pholcidae já descritas, trabalhar com táxon dessa família ainda é difícil, principalmente devido ao tráfico de espécies, que traz consequências negativas para os pesquisadores induzindo-os a erro no momento da catalogação, que, na maioria das vezes, as anotações sobre a origem das espécies, tais como, local da coleta (continente, país, estado) são passadas de forma incorretas (BRESOVIT et al., 2011).

No Brasil só se tem conhecimento de apenas 30% de sua fauna de aranhas. É o país que apresenta a fauna araneológica com maior riqueza de diversidade de aranhas, representada em coleções científicas das regiões Sul e Sudeste (BRESOVIT, 1999). O Rio Grande do Sul é o Estado que apresenta o maior número de espécies descritas, com cerca de 808 (BUCKUP et al., 2010), já Rio de Janeiro vem em segundo lugar, com 756 espécies e o Estado de São Paulo está em terceiro, com 728 espécies registradas (BRESOVIT et al., 2011).

Estudos feitos no município de Aurora do Tocantins, no ano de 2009, pelo pesquisador Robson de Almeida, da Universidade Federal de Lavras, pesquisando a diversidade de invertebrados terrestres em nove cavernas do município de Aurora, descobriram entre outras, a existência de aranhas pertencente à família Pholcidae (ZAMPAULO, 2009), no entanto, não está descrito em seu trabalho, o número exato de espécies que foram encontradas dentro da família. Essa pesquisa foi muito importante, visto que a aracnofauna da região Tocantina ainda é pouco conhecida e trabalhos como estes são escassos na região.

Nas aranhas Pholcidae pouco se nota o dimorfismo sexual, por serem de tamanhos pequenos. No entanto, se observadas de maneira mais detalhada, nota-se o dimorfismo sexual, que é baseado em três aspectos: em relação ao tamanho dos indivíduos, a espessura dos seus pedipalpos e o primeiro par de pernas, que nos machos são maiores. A fêmea adulta é maior que o macho adulto e os

pedipalpos dos machos são mais grossos, sendo que estes são utilizados como órgãos copulatórios (FOELIX, 2011).

Os indivíduos machos da família Pholcidae tem seu ciclo de vida mais curto em comparação com o das fêmeas, podendo fazer até sete ecdises até atingir a maturidade sexual, isso porque os machos saem à procura das fêmeas, ficando mais expostos a predadores. Além disso, as aranhas machos de várias espécies não se alimentam quando estão à procura de uma fêmea (FISCHER et al., 2007).

A troca do exoesqueleto (ecdises) continua nas aranhas fêmeas após atingirem o estágio adulto até sua morte, no entanto, ao contrário das fêmeas, os machos param de fazer ecdises quando atingem a fase adulta (FOELIX, 2011). Independente do estilo de vida, as aranhas machos mudam seus hábitos após fazer sua última ecdise, abandonando seus abrigos, saindo à procura de parceiras para copular durante a fase reprodutiva. O aparelho reprodutor desses indivíduos que se localiza nos pedipalpos, são estruturas complexas utilizadas para fazer a transferência do esperma para a genitália feminina durante o acasalamento (FOELIX, 2011).

2.2 Citogenética de Aranhas

2.2.1 Histórico sobre a citogenética de aranhas

A citogenética é o estudo da genética através da citologia, é uma área da ciência engloba todo e qualquer estudo relacionado aos cromossomos, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução. A citogenética de maneira geral tem despertado muito o interesse dos cientistas devido a sua grande importância para os estudos laboratoriais (GUERRA, 1988).

Durante o processo evolutivo das espécies, os cariótipos se modificaram seguindo seus próprios princípios, e a maioria desses, ainda são desconhecidos (GUERRA, 2002). Com essa modificação resultou numa grande diversidade cromossômica, a respeito do número haploide e diploide, na morfologia, no tamanho, na capacidade de pareamento meiótico, no conteúdo de heterocromatina, dentre outros.

Dentro da classe arachnídas, a ordem Araneae é a mais estudada sob o ponto de vista citogenético, no entanto, esses estudos ainda são escassos levando em consideração a riqueza de espécies existentes (REZAC et al., 2006). Existem aproximadamente 45.738 espécies descritas no WORLD SPIDER CATALOG (2016), e dentre essas, somente 771 espécies possuem algum estudo citogenético e muitos dados apresentam apenas a descrição de número diploide e os dados de bandamento cromossômicos são poucos (KRAL, et al., 2006).

Geralmente as aranhas oferecem um sistema apropriado para pesquisar a evolução de cromossomos sexuais, inclusive o emparelhamento dos mesmos. Possuem também, uma característica cariotípica que é a predominância de diversos cromossomos X, que são raros em outros grupos de animais (KRAL et al., 2011).

Segundo os conceitos de Painter, (1914); Suzuki e Okada, (1950); Mittal, (1963); Pinter e Walters, (1971), os primeiros estudos sobre citogenética em aranhas são da autoria de (CARNOY, 1885; WAGNER, 1896; BOSENBERG, 1905), tendo sua importância destacada pelo fato de ter estimulado a análise cariotípica em outras espécies.

Até meados de 1958, os dados citogenéticos eram obtidos através de gônadas de machos ou fêmea, inseridas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina férrica, e isso tornava difícil à interpretação dos resultados. Surgiu então, a técnica do esmagamento, utilizando os corantes carmin-acético ou orceína, empregada por Sharma e colaboradores (1959); Beçak Beçak (1960) e Araujo (2007).

Foram Pinter e Walters (1971) os primeiros autores a introduzir o uso da colchicina em experimentos citogenéticos, a colchicina interrompe o ciclo mitótico em metáfase, aumentando o número de células nessa fase; provoca maior adensamento dos cromossomos, permitindo uma melhor visualização das constrições primárias e secundárias, tendo uma melhora da morfologia cromossômica; além disso, os cromossomos ficam mais espalhados, por causa da destruição ou inibição das fibras do fuso acromático. Assim, por possuir estas características a colchicina tem se mostrado bastante eficiente na obtenção de células metafásicas que possibilitem boa visualização dos cromossomos. Além do uso da colchicina, os autores Brum-Zorrilla e Cazenave, (1974), já utilizavam a fixação com Metanol-Ácido Acético 3:1 e o corante Giemsa em seus estudos citogenéticos.

Nos anos 70 surgiram as técnicas de bandamento cromossômicos permitindo de maneira inequívoca a identificação de cada um dos pares de cromossomos, pois o padrão de bandas claras e escuras é único e exclusivo para cada par de cromossomos.

Ao passar dos anos, as técnicas citogenéticas foram se aprimorando. Atualmente, várias técnicas são utilizadas em análises citogenéticas, destacando a suspensão celular como a mais utilizada. No entanto, em alguns casos, a técnica de esmagamento ainda é utilizada (ARAUJO, 2013).

O primeiro estudioso a observar cromossomos provenientes de células embrionárias de aranhas foi Matsumoto (1977). Embriões de aranhas se mostraram como um valioso material na obtenção de metáfases mitóticas, pois apresentam um alto índice de divisão celular. Contudo, existe um número muito grande de tecidos que tem sido empregado nos estudos citogenéticos de aranhas. Nesse sentido,

podem ser utilizadas gônadas (ovários e testículos), além de gânglios cerebrais (WANG; YAN, 2001).

Apesar do uso de técnicas que podem identificar regiões cromossômicas específicas e que fornecem dados relevantes sobre a organização dos genomas e evolução dos cromossomos em diferentes indivíduos, até hoje, apenas cerca de 60 espécies de aranhas tiveram definição da caracterização de seus padrões de distribuição de heterocromatina constitutiva e de regiões organizadoras de nucléolos (DATSON e MURRAY, 2006; BOMBAROVÁ et al., 2007; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011).

2.2.2 Bandamento C

A técnica de bandamento C caracteriza a distribuição da heterocromatina constitutiva. A ausência da atividade gênica é uma das principais características da heterocromatina. Ela fica altamente condensada e isto está frequentemente associado ao bloqueio de transcrição, assim, mesmo que se encontrem genes na heterocromatina, se encontrarão estes permanentemente bloqueados (GUERRA, 1988).

Segundo Paula Neto (2013), esta técnica demonstrou ser bastante eficaz, pois mostra padrões longitudinais nos cromossomos que auxiliam no pareamento cromossômico e montagem de carótipos, na identificação de padrões em cromossomos sexuais e até na identificação e reconhecimento de rearranjos cromossômicos.

O bandamento C destaca as regiões de heterocromatina constitutiva, que são as regiões de DNA altamente repetitivo. Essa técnica permite uma melhor identificação e caracterização dos cariótipos com maior clareza e riqueza de detalhes (CASTRO, 2004).

De maneira geral, a técnica de bandamento C ajuda na localização das regiões de heterocromatina constitutiva que devido ao tratamento ácido-base causa uma deterioração diferencial do DNA permitindo saber a localização e a distribuição dessas regiões. Nesta técnica, as preparações cromossômicas são tratadas em

sequência com soluções de HCl, Ba(OH)_2 , 2xSSC (*Saline Sodium Citrate*) e coradas com Giemsa. Devido à dificuldade de obtenção de resultados por essa técnica, muitas variações de concentração, tempo e temperatura das soluções tem sido propostas (SUMNER, 1972).

2.2.3 Regiões Organizadoras de Nucléolos

A RON (região organizadora de nucléolo) corresponde a sequência de DNA que contém o gene responsável pela transcrição do RNA ribossômico 45S (5,8S; 18S e 28S em eucariotos superiores). Nos núcleos interfásicos é possível observar esta sequência em uma estrutura conhecida como nucléolo, cuja constituição envolve, além de DNA, proteínas específicas (CASTRO, 2004). Geralmente, durante as divisões celulares o gene 45S fica inativo, no entanto, as proteínas destas regiões ainda continuam aderidas ao gene que esteve ativo na interfase precedente permitindo, por exemplo, a sua identificação nos cromossomos metafísicos mitóticos (ARTONI, 1996).

As proteínas da RON possui reatividade com a prata, e a identificação dessas regiões com este íon ficou conhecida como AgRON (HSU et al., 1975). A prata reage seletivamente com proteínas ácidas não histônicas ricas em sulfidrílicos e dissulfetos, que sua vez, reduz os íons da prata, sendo possível observar na microscopia óptica como agregados negros no interior dos núcleos.

A quantidade de AgRONS pode não refletir a quantidades sequências de DNA ribossomal de uma espécie, pois a prata tende a marcar regiões que estiverem ativas. Os espécimes, de modo geral, apresentam um padrão conservativos de RONS ativas, sendo assim, a impregnação pela prata pode ser útil para se identificar padrões de atividade de DNA ribossomal, os quais podem ser usados como marcadores cromossômicos (ALEVI et al., 2013).

Apenas as Regiões Organizadoras de Nucléolos que estiverem ativas na interfase anterior a mitose durante a qual a célula foi fixada e corada por nitrato de prata são marcadas, e estas, podem variar a nível inter e intraespecífico, e mesmo inter-intraindividual quanto ao número, localização, intensidade e tamanho das

RONs em relação aos seus homólogos são frequentes observadas (ARTONI, 1996; CASTRO, 2004; KAVALCO et al., 2005).

De acordo com Kavalco et al., (2005), a diferença de tamanho das RONS entre cromossomos homólogos pode ser em decorrência não apenas do *crossing-over* desigual, mas também devido a duplicação accidental do DNA ou distúrbios regionais do DNA.

2.2.4 Estudos Citogenéticos na família Pholcidae

Entre os aracnídeos, a ordem Araneae é a mais estudada citogeneticamente. Apesar disso, os estudos sobre a ordem ainda são poucos, em comparação com sua grande diversidade e variabilidade de espécies. Na infraordem Araneomorphae somente cerca de 51 espécies de toda a ordem foram estudadas cromossomicamente (ARAUJO, 2013).

A família Pholcidae é a maior entre as Araneomorphae, apresentando atualmente 81 gêneros e 1.241 espécies descritas, sendo responsável por grande parte de toda a diversidade da infraordem (WORLD SPIDER CATALOG, 2016) e somente 25 espécies foram estudadas citogeneticamente. Estas análises mostraram variação cromossômica interespecífica com números diploides de $2n=15$ a $2n=32$. O sistema cromossomo sexual (SCS) prevalecente na família Pholcidae, foi o do tipo X/XX, mas, os tipos $X_1X_2/X_1X_1X_2X_2$ e $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ também foram registrados para algumas espécies (CODDINGTON e LEVI, 1991; PLATNICK et al., 1991; RAMÍREZ, 2000).

A morfologia cromossômica predominante foi a metacêntrica. Segundo Král e colaboradores, (2006), o SCS do tipo X_1X_2Y pode não ter sido identificado em alguns casos, tal como em *Spermophora senoculata*, considerando o tamanho do cromossomo Y que é muito pequeno, levando à descrição de um sistema do tipo X_1X_2 . Um aumento da representatividade dos dados citogenéticos, com análises dos diversos clados de Pholcidae ainda não estudados, poderá contribuir no estabelecimento de relações entre os cariótipos encontrados dentro da família. A Tabela 1 traz um resumo geral de todos os dados citogenéticos publicados até o presente momento para indivíduos pertencentes à família Pholcidae.

Tabela 1. Dados cromossômicos da família Pholcidae. **Citada como** = nome da espécie adotado pelo autor que realizou a análise citogenética; **2n** = número diploide em indivíduos machos, **SCDS** = sistema cromossômico de determinação sexual; **T** = telocêntrico; **A** = acrocêntrico; **Sm** = submetacêntrico; **M** = metacêntrico.

Pholcidae (Opisthothelae, Araneomorphae, Haplogynae)						
Espécie	Citada como	2n	SCDS	Morfologia cromossômica	Procedência	Referência
<i>Artema atlanta</i> Walckenaer, 1837.	<i>Artema atlanta</i>	32	X ₁ X ₂	---	Índia	Parida; Sharma, 1987a.
<i>A. atlanta</i> Walckenaer, 1837.	<i>Artema atlanta</i>	32	X ₁ X ₂	---	Índia	Sharm; Parida, 1987.
<i>Crossopriza lyoni</i> (Blackwall, 1867).	---	27	X	26M + XM	Índia	Bole-Gowda, 1958.
<i>C. lyoni</i> (Blackwall, 1867).	---	25	X	---	Índia	Srivastava; Shukla, 1986
<i>C. lyoni</i> (Blackwall, 1867).	---	23	X	---	Índia	Parida; Sharma, 1987a.
<i>C. lyoni</i> (Blackwall, 1867).	---	23	X	---	Índia	Sharma; Parida, 1987.
<i>Holocnemus caudatus</i> (Dufour, 1820).	---	23	X	16M+6Sm+XM	Portugal	Král et al., 2006.
<i>Mesabolivar luteus</i> (Keyserling, 1891).	---	15	X	M	Brasil	Araujo et al., 2005.
<i>Micropholcus fauroti</i> (Simon, 1887).	---	17	X	M	Brasil	Araujo et al., 2005.

<i>Pholcus crypticolens</i> Bösenberg & Strand, 1906	---	24	X_1X_2	$22M+X_1X_2A$	Japão	Suzuki, 1954.
<i>Pholcus manuelei</i> Gertsch, 1937.	<i>Pholcus affinis</i>	25	X	$A-T+XSm$	China	Xiuzhen et al., 1997a.
<i>Pholcus phalangioides</i> (Fuesslin, 1775).	---	25	X_1X_2Y	$18M+4Sm+X_1M+X_2Sm+YM$	República Tcheca	Král et al., 2006.
<i>Pholcus sp.</i>	---	26	X_1X_2	---	Índia	Sharma; Parida, 1987.
<i>Physocyclus californicus</i> Chamberlin e Gertsch, 1929.	---	15	X	$14M+XM$	EUA	Cokendolpher, 1989.
<i>Physocyclus enaulus</i> Crosby, 1926.	---	15	X	$14M+XM$	EUA	Cokendolpher, 1989.
<i>Physocyclus sp.</i>	---	15	X	---	---	Cokendolpher; Brown, 1985.
<i>Physocyclus sp.</i>	---	15	X	$14M+XM$	EUA	Cokendolpher, 1989.
<i>Spermophora senoculata</i> (Dugès, 1836).	<i>Spermaphora meridionalis</i>	----	X_1X_2	---	---	Painter, 1914.
S. <i>senoculata</i> (Dugès, 1836)	---	25	X_1X_2Y	$22M+X_1X_2YM$	Portugal	Král et al., 2006.

Fonte: PLATNICK, (2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Descrição da coleta do material

Foram analisados cromossomicamente 94 indivíduos adultos, todos pertencentes à família Pholcidae da espécie *P. phalangioides*, sendo 48 machos, 46 fêmeas (ambos vivos) e nove embriões, exibidos na figura 3 (a, b e c). Os exemplares foram coletados de forma aleatória no período diurno, entre os meses de Fevereiro a Outubro de 2015, e Janeiro a Maio de 2016, em casas residenciais e comerciais localizadas no centro da cidade e no bairro Nova Araguatins no município de Araguatins – TO (Latitude 5° 39' 22" S e 48° 7' 8" O) assim como também no almoxarifado do IFTO – *Campus Araguatins* (Latitude 5°38'42.0" S e 48°04'20.2" W). A Tabela 2, mostra a relação com os locais de coleta das aranhas.

Tabela 2. Relação do número de aranhas coletadas, família, espécime, sexo e local de coleta dos indivíduos analisados citogeneticamente.

Família	Espécie	Nº de Indivíduos	Sexo	Local de Coleta
Pholcidae	<i>P. phalangioides</i>	11 31	M F	Rua 13 de Outubro (Residência)
		08 13	M F	Rua Álvares de Azevedo (Residência)
		02 00	M F	Rua Quintino Bocaiúva (Colégio Leônidas)
		10 02	M F	Rua Floriano Peixoto (C. Mota)
		16 00	M F	Rua Dom João VI (Residência)
		01 00	M F	IFTO (Almoxarifado)

Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

Os exemplares coletados foram encontrados nos tetos de casas abandonadas, nos cantos das paredes, esconderijos, debaixo de móveis, nos

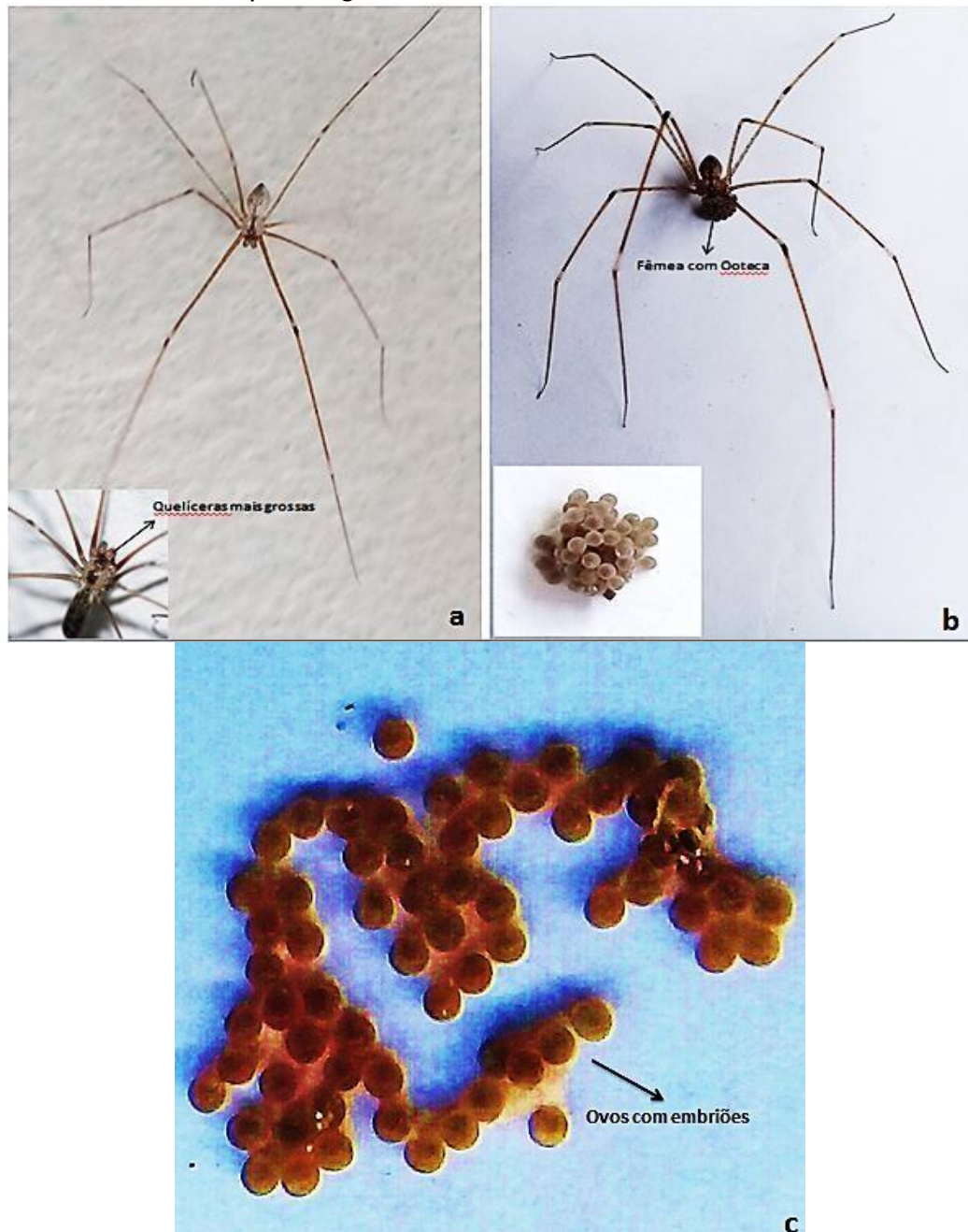
estabelecimentos comerciais foram encontrados por trás das prateleiras de alimentos não perecíveis, debaixo das bancadas de frutas, no teto dentre outros locais. Durante as coletas não foi necessário o uso de equipamento de proteção individual (E.P.I), pois essa espécie de aranha é inofensiva ao ser humano.

As aranhas foram capturadas naturalmente ainda vivas, uma vassoura foi utilizada para alcançar os locais mais altos (teto das casas), eram capturadas com as mãos e colocadas em um pote de plástico em seguida eram transferidas para uma pequena caixa de papelão, contendo algumas perfurações nas laterais para que houvesse entrada de ar. As aranhas vivas foram levadas ao laboratório de citogenética, para fazer a extração das gônadas.

Para a retirada das gônadas as aranhas eram submersas a uma solução fisiológica para insetos (preparada um dia anterior e conservada na geladeira a uma temperatura padrão de 4º C), os indivíduos eram fixados com alfinetes entomológicos em uma placa de petri contendo cera de vela na cor preta, essa cor foi escolhida por facilitar a visualização das gônadas após extração, pois esse material biológico possui uma coloração esbranquiçada.

Ao passo em que as gônadas íam sendo retiradas, as aranhas eram armazenadas em potes plásticos contendo uma solução de álcool 70% devidamente etiquetados com data, local e nome do responsável pela coleta, para identificação taxonômica, que foi realizada pelo Dr. Antônio Domingos Brescovit, do Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Na figura 3 (a, b e c), estão as imagens dos exemplares utilizados no estudo para extração das gônadas. As preparações cromossômicas foram feitas no laboratório de Citogenética do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins - Campus Araguatins.

Figura 3. Exemplares estudados citogeneticamente. **a.** Aranha macho destacando suas quelíceras. **b.** Aranha fêmea carregando seus filhotes (Ooteca) e **c.** Embriões de *P. phalangioides* em fase bem desenvolvida.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017).

3.1.2 Análise dos cariótipos

As preparações citológicas foram analisadas com o auxílio de microscópio de luz. Após a observação, as melhores metáfases mitóticas foram selecionadas

para serem fotografadas, utilizando o microscópio óptico (aumento de 1000x) usando óleo de imersão. Para determinar o número diploide foi feita a contagem dos cromossomos de todas as células encontradas em divisão. Para determinação da morfologia cromossômica foi feita a análise da posição do centrômero e do tamanho dos braços cromossômicos.

3.1.3 Montagem do cariótipo

Para montar o cariótipo, os cromossomos foram organizados em pares e em ordem decrescente de tamanho. O cariótipo foi montado no programa Photoshop CS6 e organizado de acordo com tamanho e seguindo a posição do centrômero.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos cromossomos meióticos e mitóticos, segundo Araujo et al. (2007).

A técnica descrita por Araujo et al. (2007), com algumas alterações, foi utilizada para a obtenção das preparações cromossômicas de testículos, ovários e embriões de *P. phalangioides*. Os procedimentos estão descritos abaixo:

Os exemplares foram submetidos a uma solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na_2HPO_4 , 2,72g de KH_2PO_4 , diluída em litro de água destilada), para que pudesse ser realizada a retirada das gônadas;

Depois da retirada das gônadas, o material biológico foi colocado em uma solução de colchicina a 0,16% (05 gotas), preparada com uma solução fisiológica para insetos, durante 1 hora, para que ocorresse o acúmulo de metáfases nas células;

Em seguida, foi adicionado 05 gotas de água de torneira, para atuar como solução hipotônica, deixando agir durante 15 minutos;

Após esse período, as gônadas foram transferidas para tubos tipo “eppendorf” contendo solução fixadora (metanol/ácido acético (3:1)) e armazenadas a uma temperatura padrão de 4°C.

3.2.2 Preparação das lâminas

Para a preparação cromossômica o material biológico foi colocado sobre uma lâmina de vidro, contendo uma gota de ácido acético a 60% recém-preparado para facilitar a dissociação do tecido, em seguida foi macerado com o auxílio de um bastão de vidro até formar uma suspensão celular;

Posteriormente, a lâmina foi seca sobre uma placa de metal a uma temperatura padrão de 35 a 40°C.

3.2.3 Coloração Convencional (Giemsa)

Depois das lâminas prontas, foram colocadas dentro de um porta lâminas de plástico com capacidade para três lâminas, contendo 50mL de solução Giemsa (preparada com 1,5mL de Giemsa a 2%, 1,5mL de tampão fosfato e 47mL de água destilada) para serem coradas por um período de 30 minutos;

Decorrido o tempo de coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente;

Após estarem secas, as lâminas prontas foram analisadas ao microscópio de luz.

3.2.4 Técnica de Bandamento C

A técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações, foi utilizada na identificação da heterocromatina constitutiva. O protocolo utilizado para a visualização da heterocromatina está descrito abaixo:

As lâminas utilizadas para aplicação dessa técnica são preparadas de acordo com o item 3.2, contudo, não foram coradas com Giemsa;

As preparações cromossômicas foram tratadas com uma solução de HCl 0,2N (N=Natural) à temperatura de ~45°C durante 2 minutos, e depois lavadas com água destilada;

Em seguida, essas lâminas foram colocadas em uma cuba contendo solução de hidróxido de bário a 5%, à temperatura de ~45°C, durante 30 minutos; após esse período foram lavadas sequencialmente em HCl 0,2N (N=Natural) em temperatura ambiente e em água destilada;

Essas lâminas foram incubadas em solução de citrato de sódio 2xSSC a 60°C por 30 minutos e em seguida foram lavadas em água destilada;

Após a secagem as preparações cromossômicas foram coradas com Giemsa a 2% por 30 minutos. Posteriormente, lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente e então analisadas ao microscópio de luz.

3.2.5 Técnica de AgRON (Região Organizadora de Nucléolo marcada pelo Íon prata)

Para a identificação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), foi utilizada a técnica de impregnação pela prata descrita por Howell e Black (1980), com algumas alterações:

As lâminas utilizadas para aplicação dessa técnica não foram coradas com o corante Giemsa;

Sobre cada lâmina foram pingadas duas gotas de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1mL para cada 100mL de solução) e seis gotas de solução de nitrato de prata a 50%;

Cada lâmina foi coberta com uma lamínula e levada para estufa a uma temperatura de 60°C em câmara úmida por um período de 7 minutos ou até obter uma coloração marrom;

Decorrido esse tempo, as lâminas eram retiradas da estufa e foram lavadas com água de torneira, retirando a lamínula com o fluxo de água;

Após estarem secas, as lâminas prontas foram analisadas ao microscópio de luz.

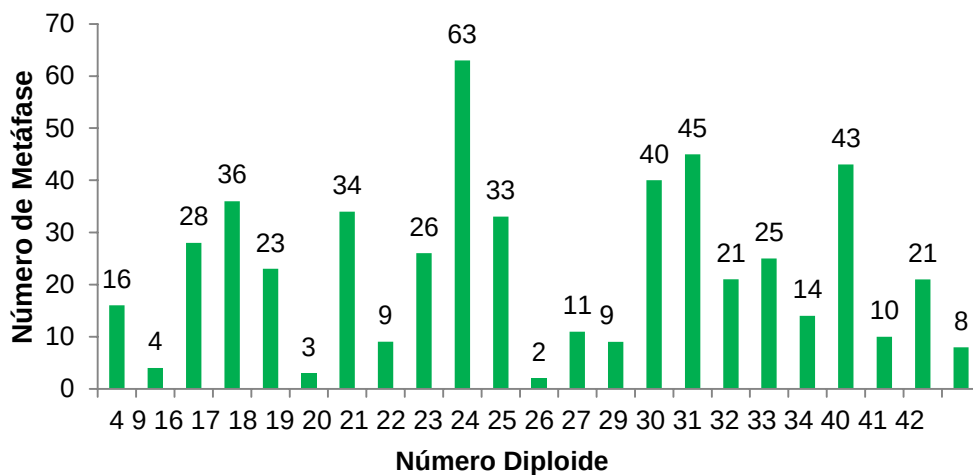
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

4.1.1 Coloração convencional Giemsa em *P. phalangioides*

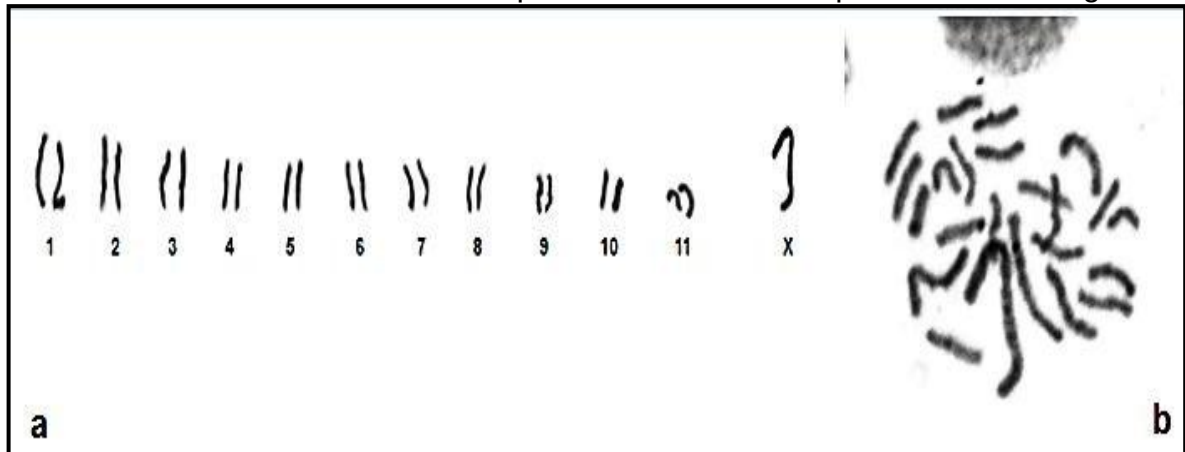
No presente trabalho foram analisados cromossomicamente 94 indivíduos, 48 machos, 46 fêmeas e 09 embriões, dos quais foram obtidos resultados para 47 machos, 14 fêmeas e 02 embriões da espécie *P. phalangioides*. Em testículos foram analisadas 514 células em metáfase mitótica (Figuras 4), e o número diploide encontrado nos exemplares observados foram de $2n=23$ (Gráfico 1) em machos e $2n=24$ em fêmeas (Figura 5). A morfologia cromossômica observadas foi de metacêntricos e submetacêntricos. As fêmeas mostraram resultados para 69 células em metáfases mitóticas (Figura 6), o número diploide encontrado foram $2n=24$ cromossomos em metáfases oogoniais (Gráfico 2). Os embriões analisados mostraram resultados para 09 células em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 7). Nos embriões não foi possível definir o número diploide, devido ao empilhamento dos cromossomos, impossibilitando sua contagem e montagem do cariótipo.

Gráfico 1. Histograma representativo das frequências dos números diploides encontrados nos indivíduos machos de *P. phalangioides*.



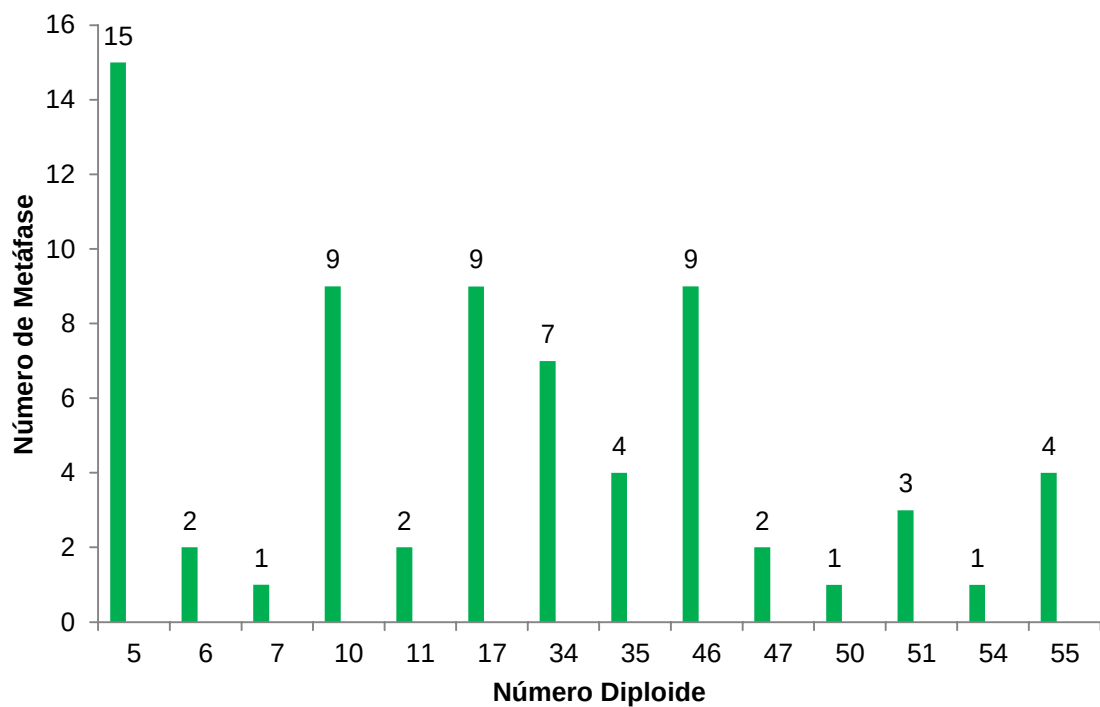
Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

Figura 4. Cromossomos mitóticos de macho. **a.** Cariótipo com $2n=23$ cromossomos. **b.** Célula em metáfase mitótica na qual se obteve o cariótipo mostrado na figura **a**.



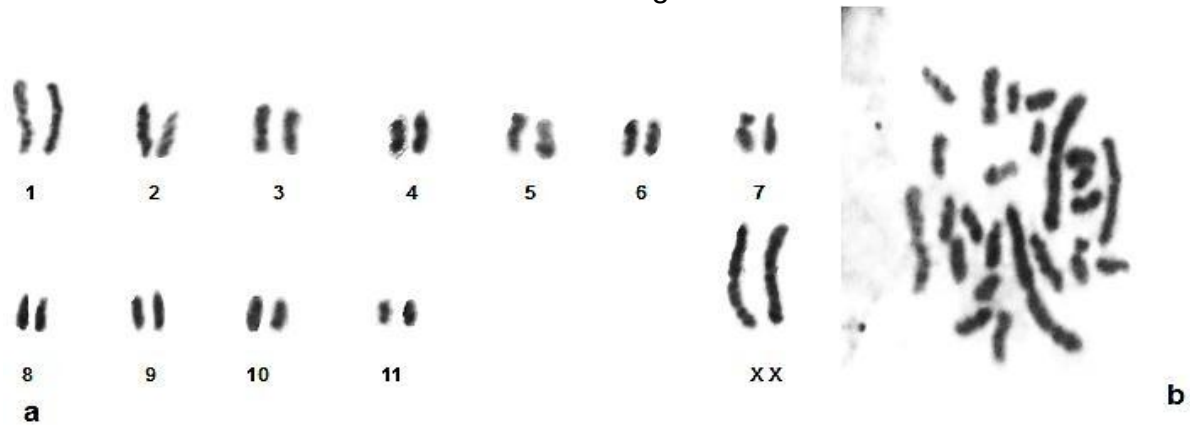
Fonte: SOUZA, C. F. (2017).

Gráfico 2. Histograma representativo das frequências dos números diploides encontrados em aranhas fêmeas de *P. phalangioides*.



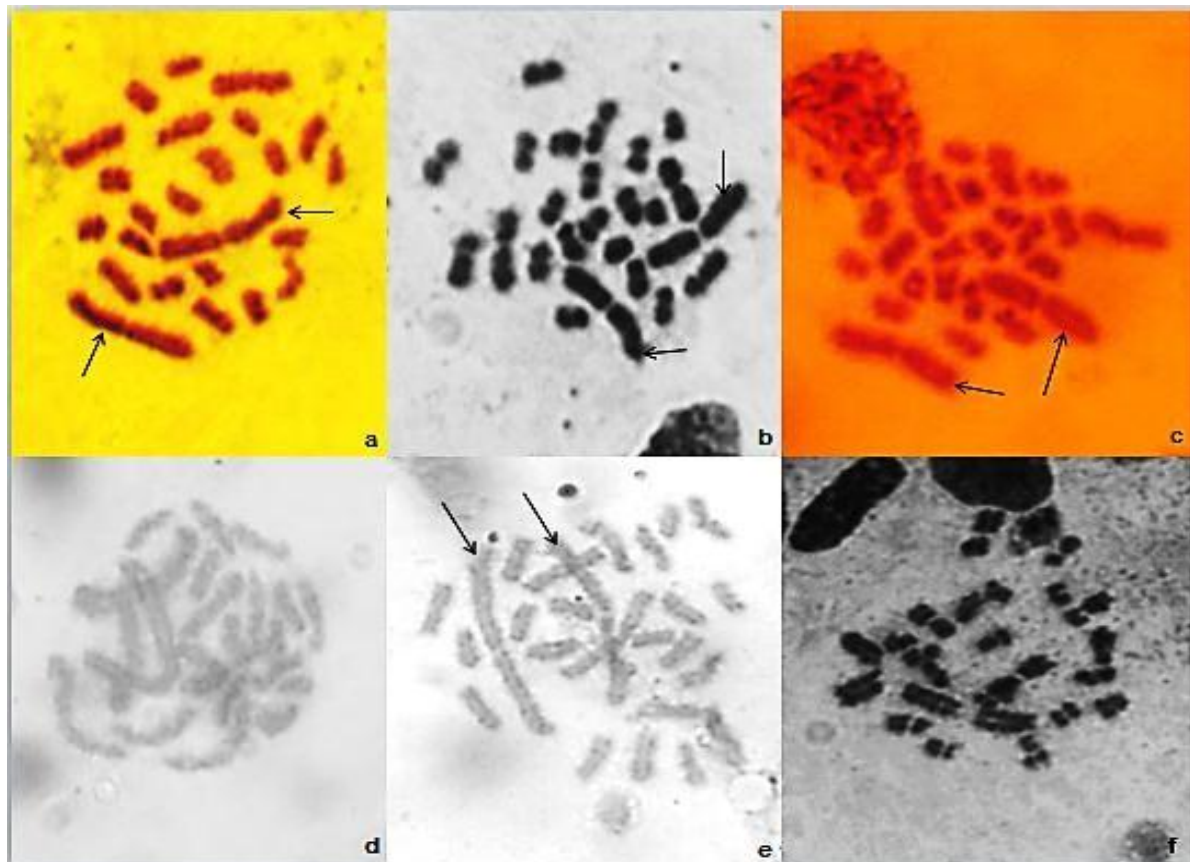
Fonte: SOUZA, C. F. (2017).

Figura 5. Cromossomos mitóticos de fêmea de *P. phalangioides*. **a.** Cariótipo com $2n=24$ cromossomos. **b.** Célula em metáfase mitótica na qual se obteve o cariótipo mostrado na figura a.



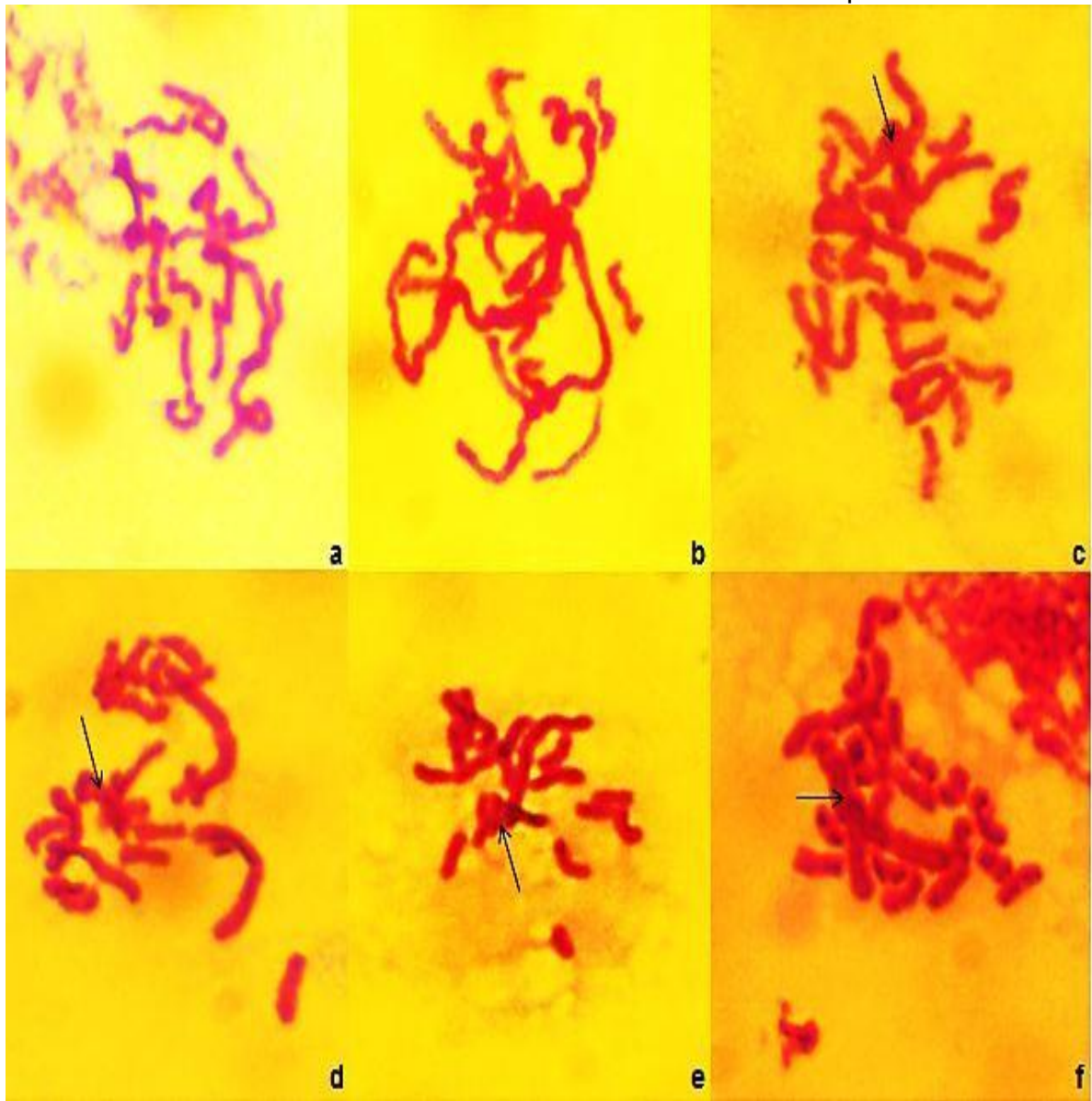
Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

Figura 6. Cromossomos em metáfase mitótica encontrados em fêmeas de *P. phalangioides*. Respectivamente, corados com Giemsa. Contendo número diploide igual ($2n=24=22A + XX$) nas figuras (a, b, c, d, e e f). Setas mostram o cromossomo sexual X.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

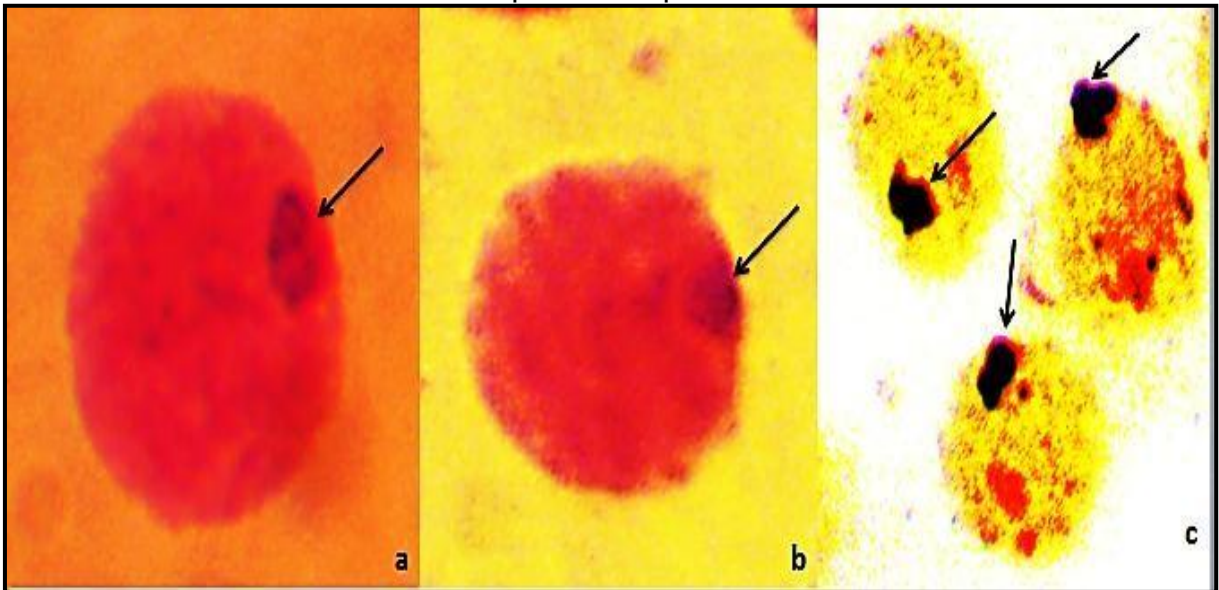
Figura 7. Cromossomos de embriões de *P. phalangioides* em diferentes estágios de desenvolvimento. Corados com Giemsa. **a e b.** Paquítenos em fase final. **c, d, e, f.** Metáfases mitóticas. Setas indicam cromossomos empilhados.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

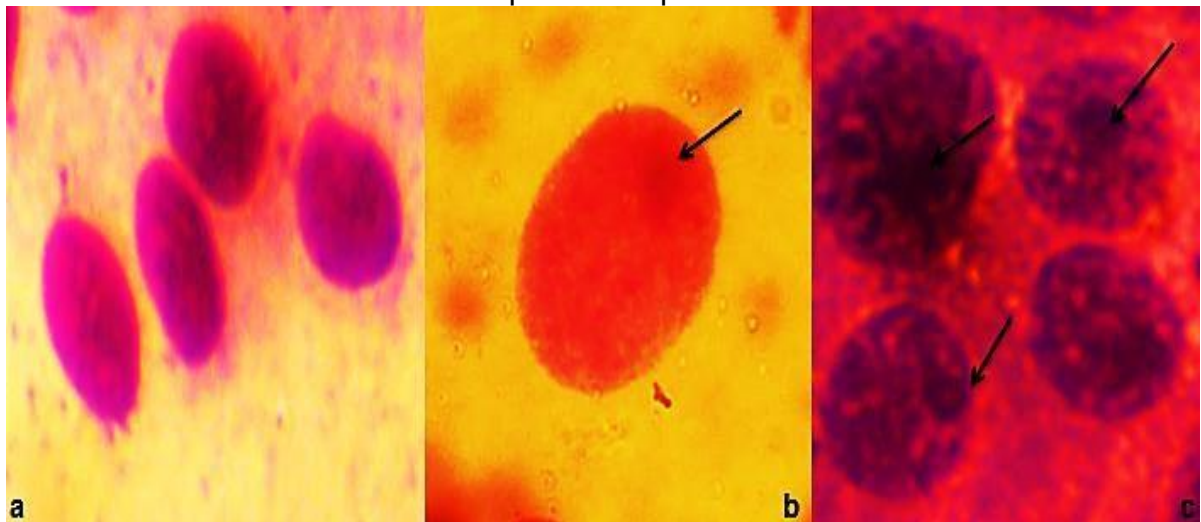
Os núcleos interfásicos de macho de *P. phalangioides* mostraram blocos heteropicnóticos nas três colorações utilizadas (Giemsa, Bandamento C e AgRON) (Figura 8). Os núcleos interfásicos corados com Giemsa continham blocos heteropicnóticos positivos que podem ser correlacionados com o cromossomo sexual X (Figura 8a) e (Figura 9b e c), em ambos os sexos.

Figura 8. Núcleos interfásicos de machos de *P. phalangioides*. **a.** Corado com Giemsa; **b.** Corado através da técnica de bandamento C e **c.** Corados através da impregnação pelo íon prata (AgRON). Setas indicam os blocos de cromatina heteropicnóticos positivos.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017).

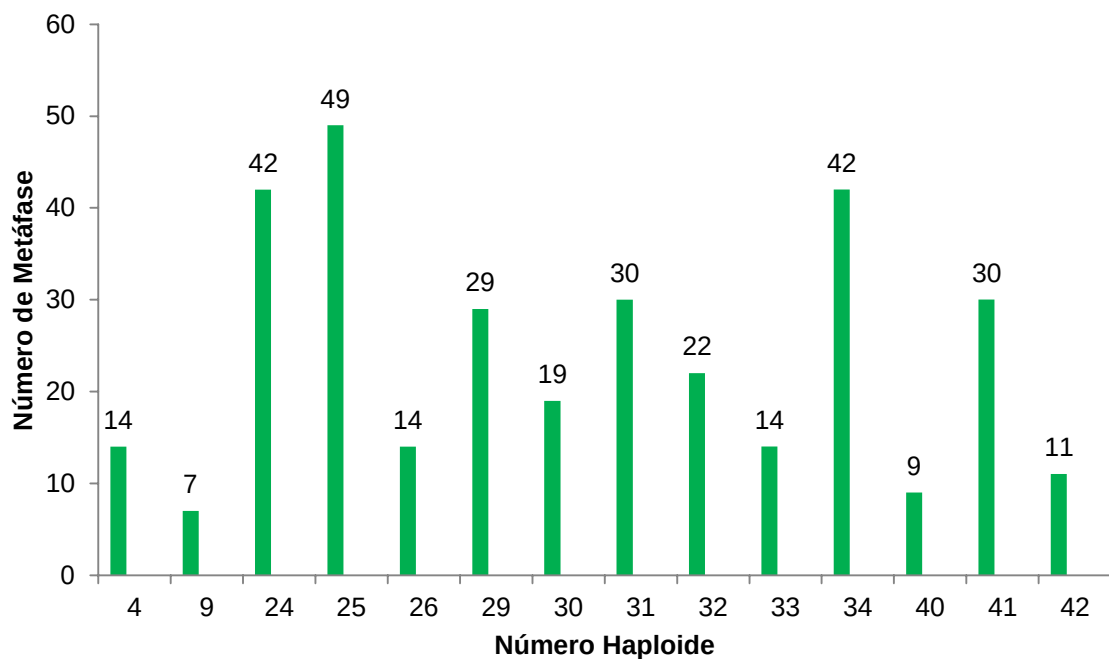
Figura 9. Núcleos interfásicos de fêmea de *P. phalangioides*. **a, b e c.** Corados convencionalmente com Giemsa. Setas indicam os blocos de cromatina heteropicnóticos positivos.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017).

Neste trabalho, foram encontradas 332 células meióticas em 14 exemplares machos de *P. phalangioides*. Nessas células o complemento haploide (Gráfico 3) mostrou uma variação inter - e intraindividualmente de $2n=11$ a $2n=12$, porém, o número predominante foi $2n=12$ (Figura 10). Dessas células meióticas analisadas, 133 estavam na fase de paquíteno. Em todos os paquítenos analisados houve a presença de blocos heteropícnóticos positivos (Figura 11). Não foram encontradas células meióticas em exemplares fêmeas.

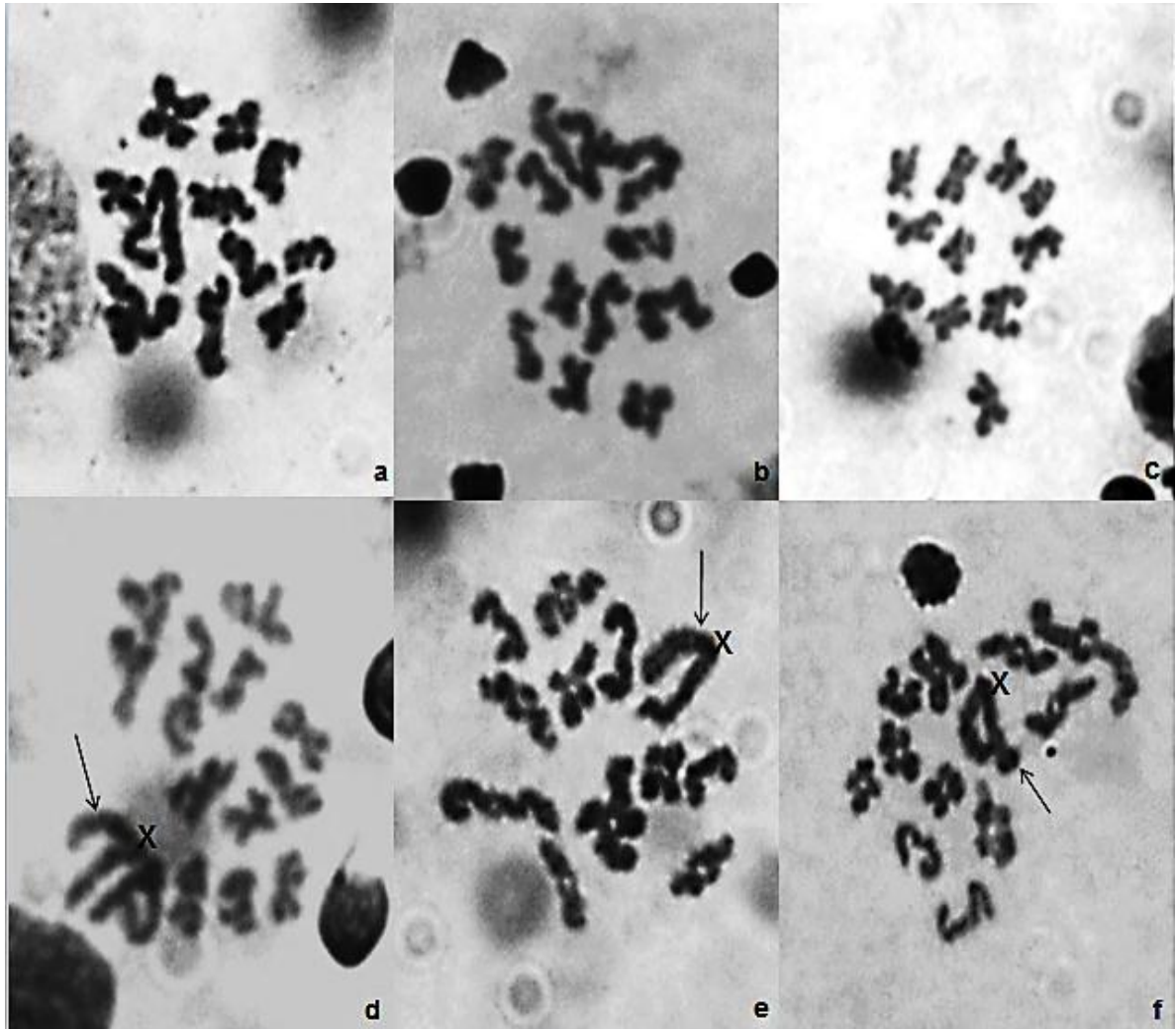
Gráfico 3. Histograma representativo das frequências dos números haploides encontrados em machos de *P. phalangioides*.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

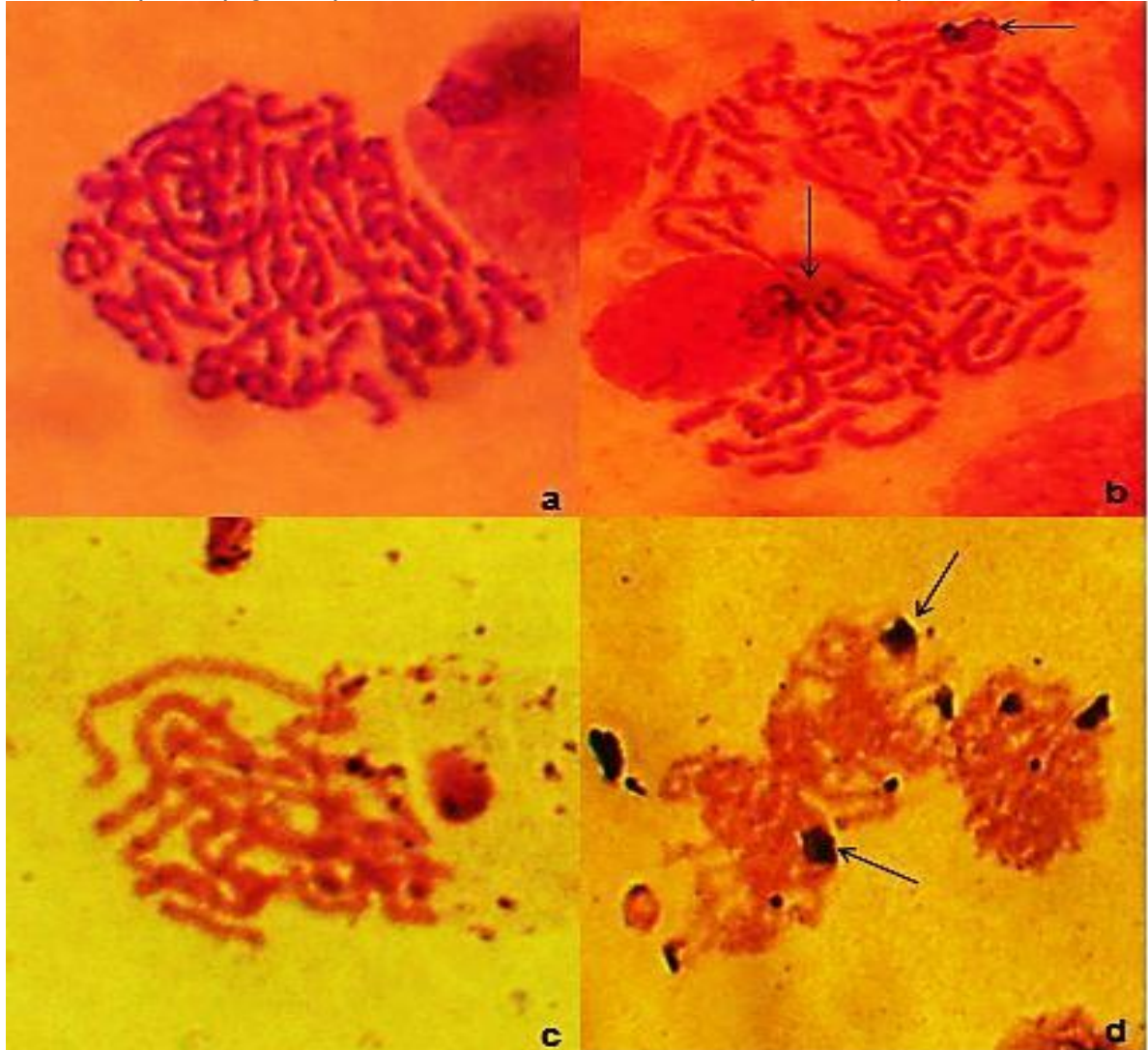
No presente trabalho foi encontrado um elevado número de células haploides em indivíduos machos de *P. phalangioides*, no gráfico 3 demonstra a relação de exemplares analisados e seus respectivos números de metáfases encontradas em cada exemplar.

Figura 10. Células meiotóticas de exemplares machos de *P. phalangioides*. Todas as células (a, b, d, e, f) são diacineses/metáfases I com ($2n = 11II + X$), exceto a letra c que é uma metáfase II. Coradas com Giemsa, Mostrando números haploides de $n = 11A + X$. Setas indicando o cromossomo sexual X.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017).

Figura 11. Células meióticas de exemplares machos de *P. phalangioides*. **a.** Paquíteno corado com Giemsa. **b.** Células no final da fase de paquíteno e entrando diplóteno coradas com Giemsa. **c.** Paquíteno corado através da técnica de bandamento C e **d.** Células em paquíteno coradas através da impregnação pelo íon prata (AgRON). Setas indicam blocos heteropicnóticos positivos.

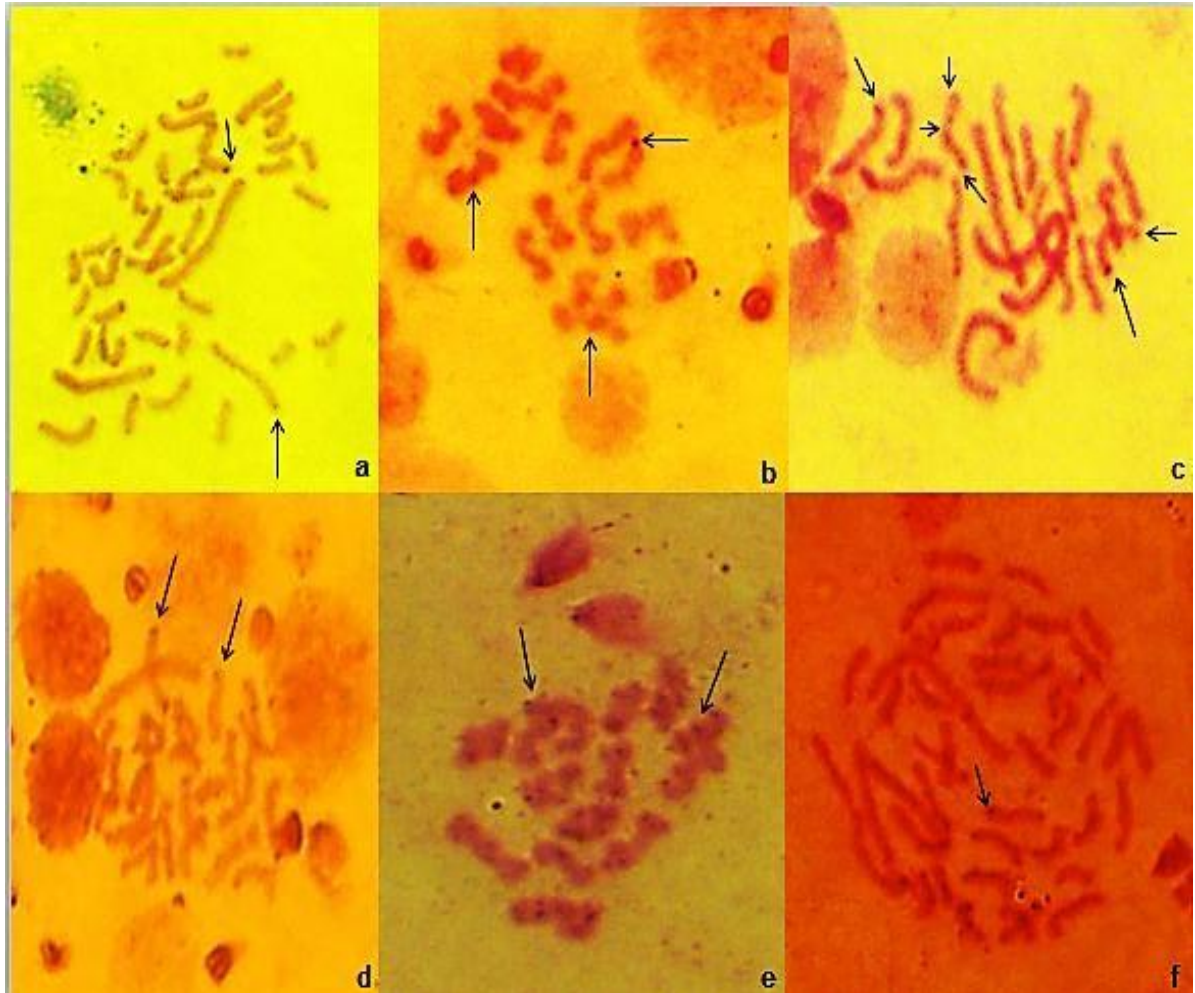


Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

4.1.2 Bandamento C de *P. phalangioides*

O padrão de distribuição heterocromatina constitutiva se fez presente em regiões teloméricas, centroméricas e pericentroméricas. Houve marcação em quatro pontos de um cromossomo metacêntrico. Essa marcação se repetiu em outras metáfases espermatogoniais submetidas à técnica de bandamento C (Figura 12).

Figura 12. Cromossomos de *P. phalangioides* macho, corados através da técnica de bandamento C e com $2n=12$. **a.** Metáfase espermatogonial. **b.** Diacinese. **c.** Metáfase espermatogonial. **d.** Metáfase espermatogonial. **e.** Metáfase II. **f.** Diacinese. Setas (fig. **c**) indicam autossomo com quatro marcações longitudinais para a distribuição da heterocromatina constitutiva e marcações dos telômeros e centrômeros dos autossomos.



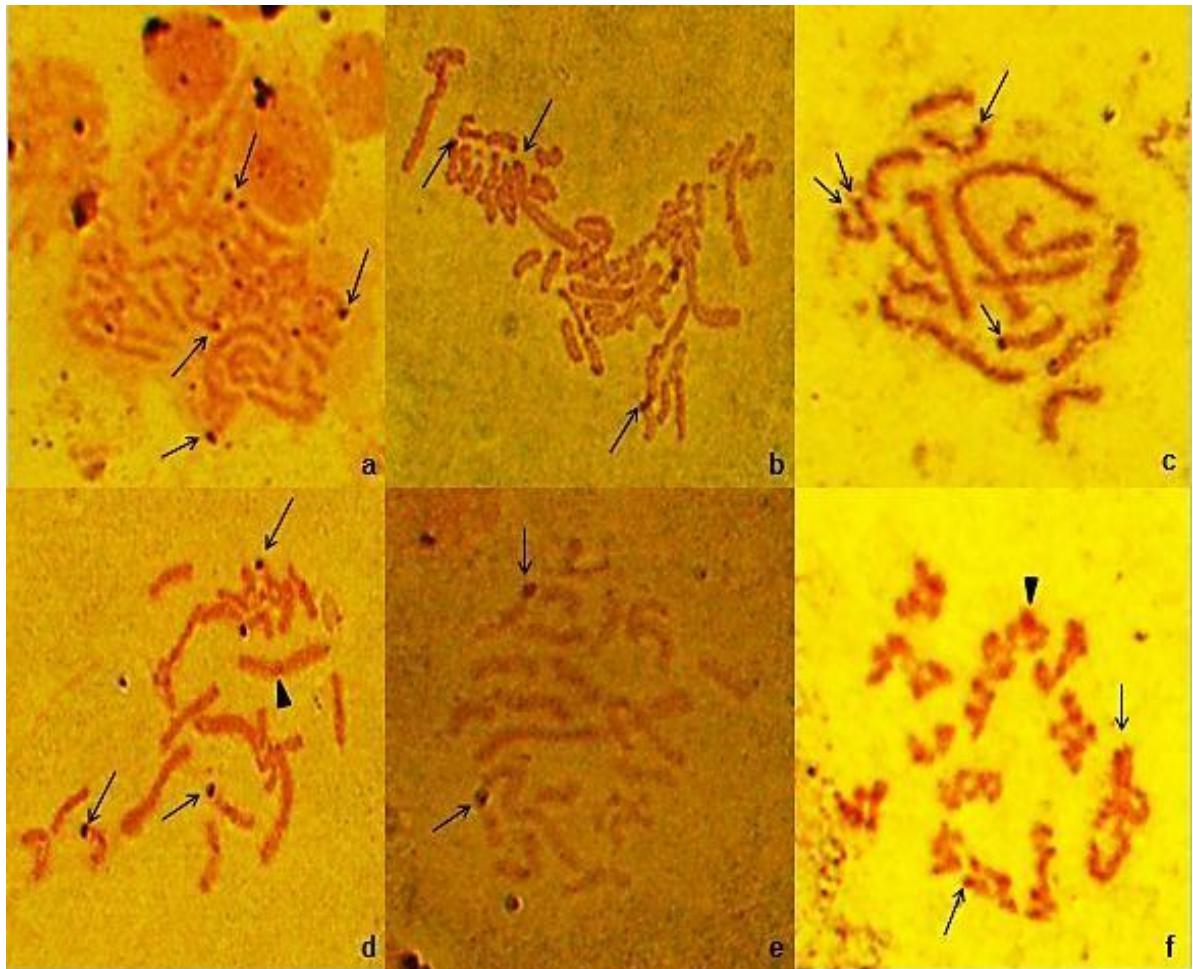
Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

A técnica de bandamento C demonstrou em células meióticas de machos, as duas regiões teloméricas dos bivalentes de núcleos derivados de glândulas testiculares. As células em metáfases oogoniais de fêmeas e metáfases mitóticas de embriões, não foram submetidas à técnica de bandamento C. Portanto, não houve resultados de padrão de bandamento C em células meióticas de fêmeas e nem de células de embriões.

4.1.3 Região Organizadora de Nucléolo em *P. phalangioides*

Foram analisadas 28 metáfases espermatogoniais coradas com a técnica de AgRON. As marcações com nitrato de prata (AgRON) para os exemplares de *P. phalangioides*, evidenciou as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONS) ativas situadas na região terminal de cromossomos submetacêntricos. Estas marcações variaram de 1 a 2, sempre no mesmo par cromossômico (figura 13). As RONS são correspondentes às constrições secundárias e apresentam um heteromorfismo de tamanho muito marcante (figura 13).

Figura 13. Cromossomos de *P. phalangioides* machos, corados através da técnica de AgRON.. **a.** Metáfase espermatogonial. **b.** Metáfase mitótica. **c.** Metáfase espermatogonial com $2n=15$. **d.** Metáfase espermatogonial com $2n=17$. **e.** Metáfase espermatogonial e **f.** Diplóteno com $2n=13$. Setas indicam cromossomos portadores de RONS.



Fonte: SOUZA, C. F. (2017)

4.2 Discussão

A infraordem Araneomorphae possui um grande grupo de aranhas que são pouco estudadas citogeneticamente, devido, principalmente a dificuldade em se obter divisões celulares nos indivíduos pertencentes a esse grupo. Além disso, suas gônadas são muito pequenas, dificultando a extração do material necessário para análises dos seus cariótipos. O número cromossômico é bastante variável, $2n=15$ a $2n=32$, é um número pequeno de cromossomos, em comparação aos encontrados no grupo das Mygalomorphae, mas, as sobreposições cromossômicas confundem e dificultam a interpretação dos resultados das análises citogenéticas para esse táxon.

As Araneomorphae estão distribuídas em quase todas as regiões biogeográficas. A variedade de espécies existentes é enorme, porém, ainda tem muito o que descobrir sobre a filogenia da infraordem. Somente 2% de todas as espécies foram caracterizadas cromossomicamente (INDICATTI, 2013). É grande a diversidade desse grupo de aranhas, tanto no seu tamanho corporal, quanto ao número diploide e morfologia cromossômica.

Há muito que se descobrir quando se trata aranhas. Uma estimativa de Brescovit, (1999), diz que no Brasil só se tem conhecimento de apenas 30% de sua aracnofauna. A região Tocantina tem sua fauna de aracnídeos praticamente desconhecida pela escassez de estudos que abordem essa temática. A realização das análises citogenéticas foi iniciada primeiramente pela coleta dos exemplares machos e fêmeas com seus embriões (Ootecas). Este trabalho é de suma importância, pois, além de conhecer a citogenética desses indivíduos, contribui para os achados taxonômicos. Entretanto, este é o primeiro registro citogenético para a espécie descrita nesta pesquisa e oriunda do município de Araguatins na região do extremo norte do Tocantins.

Dentre os estudos citogenéticos para indivíduos da infraordem Araneomorphae, este é o estudo que mais se obteve metáfases espermatozoniais já analisadas, há relatos de vários autores que falam da dificuldade de se conseguir células em divisão nessa infraordem. Para Suzuki (1954) e Kral et al., (2011), essa dificuldade está relacionado ao estágio de desenvolvimento em que as aranhas estavam no momento da extração das gônadas, além disso, esses autores relatam,

que a idade das aranhas influencia muito nas divisões celulares, pois, quanto mais velha for a aranha, menos divisões serão encontradas. Por tanto, os autores já citados, concluíram que os indivíduos mais jovens são mais apropriados para esse tipo de pesquisa.

P. phalangioides é uma espécie de aranha cosmopolita Huber (2011) e em outros estudos cromossômicos os cariótipos foram definidos como $2n=25$ ($22+X_1X_2Y$ macho) para exemplares da República Tcheca (KRÁL et al., 2006), e $2n=24$ ($22+X_1X_2$ macho) em espécimes da Argentina (RODRIGUES-GIL et al., 2002). Entretanto, os resultados destes estudos estão baseados em análises de células de machos, fêmeas e de embriões. No presente trabalho, foram obtidas metáfases oogoniais e o estudo de tais células sugere que a fórmula cariotípica para a população analisada de *P. phalangioides* seja $2n=23=22+XO$ para machos e $2n=24=22+XX$ para fêmeas. As células em prófase I e metáfases II de macho confirmam a presente proposição da fórmula cariotípica.

No subgrupo Haplogynae, há a predominância do Sistema Cromossômico Sexual (SCS) do tipo XO/XX , com 43% das espécies apresentando este tipo de SCS (OLIVEIRA et al., 2007). De acordo com o exposto em Král et al. (2011), em aranhas o SCS $X_1X_2/X_1X_1X_2X_2$ seria a condição ancestral, o tipo $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ a condição mais derivada e o sistema XO/XX uma condição intermediária derivada da fusão dos cromossomos X_1 e X_2 . É presumível assumir que a diferenciação do SCS da população de *P. phalangioides* estudada tenha ocorrido pela fusão dos cromossomos X_1 e X_2 , considerando que os resultados incluíram análises de machos, fêmeas e de embrião, a predominância do SCS XO/XX em haplogines, a posição basal do gênero *Pholcus* na filogenia da família Pholcidae (HUBER, 2011) e a relativa desproporção de tamanho do cromossomo X em relação aos autossomos.

A região organizadora de nucléolo foi observada na região telomérica de autossomos e do cromossomo sexual X em diferentes espécies da família Pholcidae (BENAVENTE; WETTSTEIN, 1980; ARAUJO et al., 2005; KRÁL et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; ARUNKUMAR; JAYAPRAKASH, 2015). Contudo, em *Physocyclus globosus*, as RONS foram encontradas na região intersticial de um par de autossomos (OLIVEIRA et al., 2007). A condição telomérica das RONS na maioria das espécies, inclusive na população de *P. phalangioides* analisada, sugere que a

evolução cromossômica em Pholcidae não envolve necessariamente a realocação desta região, como ocorrido em *P. globosus*.

A ausência AgRON no cromossomo sexual de *P. phalangioides* pode ser resultado da falta de atividade desta região na intérfase precedente e não pela inexistência de cistrons rDNA. Assim, a presença de 2 nucléolos pode estar relacionada a dissociação desta estrutura e não com a presença de RONS ativas adicionais (OLIVEIRA et al., 2007).

Os números diploides encontrados na família Pholcidae variaram de $2n=23$ a $2n=32$, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, assim, os resultados, quanto ao número diploide e morfologia cromossômica, obtidos para a população de *P. phalangioides* analisada no presente trabalho ($2n=23$ macho e $2n=24$ fêmea), estão consoantes com o padrão observado para a família.

A presença de quiasmas na maioria dos bivalentes de *P. phalangioides* analisados é outra característica comum na referida família, e estas configurações podem ser indicativas de uma intensa permuta entre os cromossomos. Além disso, o estudo das células testiculares mostrou que os bivalentes autossômicos e o cromossomo sexual univalente X têm comportamento regular e similar, quanto à condensação, sinapse, número e tipo de quiasmas, àqueles descritos por diferentes autores (SUZUKI, 1954; BOLE-GOWDA, 1958; COKENDOLPHER, 1989; TUGMON; BROWN; HORNER, 1990; GORLOV; GORLOVA; LOGUNOZ, 1995; GORLOVA et al., 1997; SHYH-HWANG, 1999; RODRÍGUEZ-GIL et al., 2002; ARUNKUMAR; JAYAPRAKASH, 2015).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *P. phalangioides* encontrada na região tocantina apresenta resultados que estão de acordo com padrão para a família Pholcidae. Essa espécie apresenta característica similar, considerando a distribuição da heterocromatina constitutiva que ocorreu nas regiões telomérica, centromérica e pericentromérica e na morfologia cromossômica. Os dados citogenéticos encontrados em *P. phalangioides*, são inéditos na região, pois não há registro de estudos cromossômicos da referida espécie nessa localidade.

As células dos indivíduos machos em diplóteno, diacinese ou metáfase I analisadas continham 12 elementos cromossômicos, sendo 11 bivalentes autossômicos e o cromossomo X univalente. Os blocos de heterocromatina heteropicnóticos positivos que se apresentou nos paquítenos de *P. phalangioides*, sugerem que nesses indivíduos exista um sistema de determinação sexual, pois estes blocos estão relacionados à cromatina sexual.

As análises de metáfases oogoniais e espermatogoniais permitiram inferir que o sistema cromossômico sexual da população de *P. phalangioides* estudada é XO para machos e XX para fêmeas. Estudos futuros poderão confirmar esses dados. Não foi possível determinar o sistema de cromossomo sexual dos embriões, devido às poucas divisões celulares e as sobreposições dos cromossomos. Somente futuras análises, com um número maior de metáfases mitóticas podem alcançar esse resultado.

Os resultados das células coradas através da técnica de bandamento C, mostrou um padrão predominantemente telomérico e centromérico em metáfases mitóticas de machos de *P. phalangioides*, o que está de acordo para a família. Os núcleos interfásicos se revelaram totalmente heteropcnóticos positivos, sugerindo assim, que todos os indivíduos estudados possuem cromossomo sexual.

A impregnação pela prata marcou a região adjacente em telômeros nos pares de autossomos nas metáfases espermatogoniais, e evidenciou de 1 a 2 nucléolos. A técnica de AgRON não foi feita em células de fêmeas.

No presente estudo, apesar das análises das metáfases mitóticas de fêmeas, a ausência de células em meiose I pode ser considerada um fator limitante

para o completo entendimento do SCS de *P. phalangioides*. A utilização da técnica de hibridação (ou hibridização) *in situ* fluorescente com sondas de rDNA, seria uma estratégia para a identificação das RONS e, dessa forma, possibilitar o uso destas regiões como marcadores cromossômicos em *P. phalangioides*.

Este trabalho caracterizou cromossomicamente a espécie *P. phalangioides*, através das análises gonadais de indivíduos machos ($2n=23$), fêmeas ($2n=24$) e de embriões (número diploide não determinado). Os resultados encontrados no presente trabalho, só foram possíveis com a utilização dessa ferramenta tão importante que é a “Citogenética” que auxiliou na caracterização cromossômica da espécie de aranha *P. phalangioides*.

Deste modo, o estudo citogenético da referida espécie analisada neste trabalho, abre uma perspectiva para um estudo mais detalhado, para que se possa obter uma melhor caracterização do táxon que a compõe. Diante disso, a citogenética pode ser uma ferramenta muito importante na ajuda da determinação da filogenia desses indivíduos.

REFERÊNCIAS

ALEVI, Kaio Cesar Chaboli et al. Análise das possíveis Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephalae* T. lenti, importantes vetores da doença de Chagas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 417-421, 2013.

ARAUJO, Douglas de. Citogenética de 13 espécies de aranhas haploginas pertencentes às famílias Pholcidae, Sicariidae e Scytodidae (Araneomorphae): evolução cromossômica, sistema cromossômico de determinação sexual e citotaxonomia. **Tese** (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2007.

ARAUJO, L. C. et al. Fontes de matéria orgânica como alternativa na melhoria das características químicas do solo e produtividade do capim-Mombaça. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, São José dos Pinhais, v. 6, n. 1, p. 65-72, 2008.

ARUNKUMAR, S.; JAYAPRAKASH. Chromosomal studies of two spider of Pholcidae (Araneae:Haplogynae). **International Journal of Current Research**, vol. 7, n. 2, p. 12650-12653, Fevereiro. 2015.

BARTH, Friedrich G. Spider senses—technical perfection and biology1. **Zoology**, v. 105, n. 4, p. 271-285, 2002.

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

BENAVENTE, R.; WETTSTEIN, R. Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and a long diffuse stage. **Chromosoma**, v. 77, p.69–81, 1980.

BOLE-GOWDA, B.N. A study of the chromosomes during meiosis in twenty-two species of indian spiders. **Proceedings the Zoological Society of Bengal**, v. 11, p. 69-108, 1958.

BOMBAROVÁ, M. MAREC, F. NGUYEN P, SCARON; PAKULOVÁ M. Divergent location of ribosomal genes in fish thorny-headed worms, *Pomphorhynchus laevis* and *Pomphorhynchus tereticollis* (Acanthocephala). **Genetica** 131: 141–149. 2007.

BONALDO, A.B. et al. Inventário e história natural dos aracnídeos da Floresta Nacional de Caxiuanã In: Caxiuanã: desafios para a conservação de uma Floresta Nacional na Amazônia ed. Belém: **Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. único, p. 577-621, 2009.

BOSENBERG, Hans. **Beitrage zur Kenntniss der Spermatogenese bei den Arachnoiden**. Zool. Jahrb. Anat. Ont. n. 21, p. 515-570, 1905. Tese de Doutorado.

BRAZIL, T.K. 2009. **Araneae**. Disponível em: Museu de Zoologia Virtual, Universidade Federal da Bahia, (<http://www.mzufba.ufba.br/aranhas.html>). Acesso em: 12/10/17.

BRESCOVIT, A. D. **Araneae**. In: C. R. F. Brandão & E.M. Cancelo (eds.). Invertebrados Terrestres. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XX. (Joly, C. A. & Bicudo, C. E. M. orgs.). FAPESP, São Paulo, v. 5, p. 45-56, 1999.

BRESCOVIT, A. D.; HUBER, B. A. Ibotyporanga Mello-Leitão: tropical spiders in Brazilian semi-arid habitats (Araneae: Pholcidae). **Insect Systematics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 15-20, 2003.

BRESCOVIT, A. D. BERTANI, R., PINTO-DA-ROCHA, R. & RHEIMS, C. A. Aracnídeos da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI): inventário preliminar e dados sobre história natural (Arachnida). In: O. A. Marques & W. Duleba (eds.). **Ambiente, Fauna e Flora da Estação Ecológica Juréia-Itatins**. Holos Editora Ltda, Ribeirão Preto, p. 198-221, 2004.

BRESCOVIT, A. D; OLIVEIRA, U.; SANTOS, A. J. Aranhas (Araneae, Arachnida) do estado de São Paulo, Brasil: diversidade, esforço amostral e estado do conhecimento. **Biota Neotrop.** 11, n. 1a, 2011. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/abstract?inventory+bn0381101a201>. Acesso em: 12 set. 2017.

BRUM-ZORRILLA, N.; CAZENAVE, A. M. Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). **Experientia** 30 (1): p. 94-95, 1974.

BUCKUP, E. H., MARQUES, M. A. L., RODRIGUES, E. N. L. & OTT, R. Lista das espécies de aranhas (Arachnida, Araneae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Zool.** v. 100(4), p. 483-518, 2010.

DE ARAUJO, Douglas et al. Chromosomal data of two pholcids (Araneae, Haplogynae): a new diploid number and the first cytogenetical record for the New World clade. **Journal of Arachnology**, v. 33, n. 2, p. 591-596, 2005.

CASTRO, R. R. **Estudos Citogenéticos em uma População de Hypostomus sp. (Siluriformes, Loricariidae) do Rio Xingu**. TCC. UFPA/CCB. 2004. 70p.

CARNOY, J. B. Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). **Zoological Studies** 38(4): p. 423-434, 1885.

CARVALHO, Juliana Barros; XAVIER, Deuzilane do Carmo; ARRUDA, Gabriel Leda. Conservação de recurso hídrico e percepção ambiental dos moradores ribeirinhos da área urbana do município de Araguatins-TO. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 7, n. 6, 2011.

CABRAL-de-Melo, D. C, MOURA, R. C, MARTINS, C. Chromosome mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rDNA and histone H3 genes in insects, and a repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity** 104: 393–400. 2010.

CODDINGTON, Jonathan A.; LEVI, Herbert W. Systematics and evolution of spiders (Araneae). **Annual review of ecology and systematics**, v. 22, n. 1, p. 565-592, 1991.

COKENDOLPHER, J.C. Karyotypes of three spider species (Araneae: Pholcidae: Physocyclus). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 97, p. 475–478, 1989.

DATSON, P. M.; MURRAY, B. G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism. **Chromosome Res** 14: 845–857. 2006.

DUTRA, A. A. de A. **Clonagem e expressão do cDNA para a toxina do veneno de *Lasiadora* sp, LTx2, em vetor de expressão pET11a**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.

FISCHER. M. L.; KRECHEMER. F. S. Interações predatórias entre *Pholcus phalangioides* (Araneae, Pholcidae) e *Loxosceles intermedia* (Araneae, Sicariidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. Vol. 24, nº. 2 – Curitiba. Junho, 2007.

FOELIX, Rainer. F. **Biology of spiders**. Third Edition: 1-419. Oxford University Press. 2011.

FOELIX, Rainer. F. **Biology of Spiders**. 2 ed. New York: Oxford University Press. 1996.

FUESSLIN, J. C. Verzeichnis der ihm bekannten schweizerischen Insekten, mit einer ausgemahlten Kupfertafel: nebst der Ankündigung eines neuen Insekten Werkes: **Zurich and Winterthur**, (Araneae), p. 60-61, 1775.

GIMENEZ-PINHEIRO, Tatiana. **Estudo citogenético em aranhas (Mygalomorphae e Araneomorphae) com ênfase na evolução dos genes de DNA ribossômicos**. 2015. 101 f. Tese – (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/134189>>.

GOLDING, A. E.; PALIULIS, L.V. Karyotype, sex determination, and meiotic chromosome behavior in two pholcid (Araneomorphae, Pholcidae) spiders: implications for karyotype evolution. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p.1-4, set. 2011.

GORLOV, I.P., GORLOVA, O.Y.; LOGUNOV, D.V. Cytogenetic studies in Siberian spiders. **Hereditas**, v. 122, p.211–220, 1995.

GORLOVA, O.Y. et al. Cytogenetic studies on seventeen spider species from Israel. **Bulletin of the British Arachnological Society**, v. 10, p. 249–252, 1997.

GUERRA, M. dos S. **Introdução à citogenética geral**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1988, 142 pg.

GUERRA, M. e SOUZA, M. J. (2002). **Como observar cromossomos. Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC – Editora, Ribeirão Preto, 2002. 131 pg.

HOWELL, W.M. T.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

HUBER, B. A. Phylogeny and classification of Pholcidae (Araneae): an update. **The Journal of Arachnology**, v. 39, p. 211–222, 2011.

HSU TC, SPIRITO SE, PARDUE ML. **Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes**. Chromosoma. 1975; 53(1): 25-36.

INDICATTI, R. P.; BRESCOVIT, A. D.; VASCONCELLOS-NETO, J. **Aranhas (Arachnida, Araneae) da Serra do Japi, Jundiaí-SP**. In: Vasconcellos-Neto, J. Polli, P.R. & Penteado-Dias, A.M.. (Orgs.). *Novos Olhares, Novos Saberes Sobre a Serra do Japi: Ecos de sua biodiversidade*. Editora CRV. Curitiba - PR. p. 273-297, 2012.

INDICATTI, R. P. **Aranhas do Parque Nacional do Itatiaia, Rio de Janeiro/Minas Gerais, Brasil**. Boletim de pesquisa do Parque Nacional do Itatiaia, 16: 1-35, 2013. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia/o-que-fazemos/pesquisa/boletins.html>. Acesso em: 2017.06.20.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R., BERTOLLO, L. A. C. & MOREIRA-FILHO, O. **Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes)**. Heredity 94, 180-186. 2005.

KRÁL, J. et al. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). **Chromosome Research**, v. 14, p. 859-880, out. 2006.

KRÁL, J. et al. Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. **Cyt.Genome. Res.**, v.133, p. 43-66, 2011.

KUHN-NENTWIG, L., R. STÖCKLIN & W. NENTWIG. Venom composition and strategies in spiders : is everything possible? **Advances in Insect Physiology** 40: 1-6. 2011.

MATSUMOTO, Seiji. An observation of somatic chromosomes from spider embryo-cells. **Acta Arachnologica**, v. 27, n. Specialnumber, p. 167-172, 1977.

MITTAL, O. P. Karyological studies on the Indian spiders I. A comparative study of the chromosomes and sex-determining mechanism in the family Lycosidae. **Res Bull Panjab Univ ns Sci**, v. 14, p. 59-86, 1963.

MOREIRA, T.S. **Levantamento da Araneofauna do Parque Nacional da Tijuca**. Monografia apresentada na Universidade Federal do Rio de Janeiro. 54 p., 2006.

MORTARI, M. R.; FERREIRA, L. B. **Neurotoxinas: perspectivas para a descoberta de novos analgésicos**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/view/467/506>>. Acesso em: 15.06.2017.

NENTWIG, Wolfgang. **Spider ecophysiology**. Springer Science & Business Media, 2013.

OLIVEIRA, Rosângela Martins et al. Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocyclus globosus* (Taczanowski 1874), and the distribution pattern of NORs (Araneomorphae, Haplogynae, Pholcidae). **Journal of Arachnology**, v. 35, n. 2, p. 293-306, 2007.

PAINTER, T. S. Spermatogenesis in spiders. **Zoologische Jahrbuecher Abteilung fuer Anatomie und Ontogenie der Tiere** v. 38: p. 509-576, 1914.

PAULA, NETO. Emygdio de. **Evolução cromossômica em aranhas caranguejeiras (Mygalomorphae) e Haploginas Basais (Araneomorphae)**. 2013. 86 f. Dissertação - (mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/87669>. Acesso em: 02.05.2017.

PINTER, Lawrence J.; WALTERS, Donna M. Karyological Studies. **Cytologia**, v. 36, n. 1, p. 183-189, 1971.

PLATNICK, N. I. **The world spider catalog, version 14.0**. American Museum of Natural History. 2013. 2014. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> Acesso em: 20 Jan. 2017.

PLATNICK, Norman I.; GRISWOLD, Charles E.; CODDINGTON, Jonathan A. On missing entries in cladistic analysis. **Cladistics**, v. 7, n. 4, p. 337-343, 1991.

RAMÍREZ, Martín J. Respiratory system morphology and the phylogeny of haplogyne spiders (Araneae, Araneomorphae). **Journal of Arachnology**, v. 28, n. 2, p. 149-157, 2000.

Řezáč M. Král J. Musilová J. Pekár S. **Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus Atypus (Araneae: Atypidae)**. *Hereditas* 143: 123-129. 2006.

RODRÍGUEZ-GIL, S.G. et al. Cytogenetic heterogeneity in common haplogyne spiders from Argentina (Arachnida, Araneae). **Journal of Arachnology**, v. 30, p. 47–56, 2002.

SHARMA, G. P.; JANDE, S. S.; TANDON, K. K. Cytological studies on the Indian spiders IV. Chromosome complement and meiosis in *Selenops radiatus* Latreille (Selenopidae) and *Leucauge decorata* (Blackwall) (Tetragnathidae) with special reference to XXX0-type of male sex determining mechanism. **Research Bulletin (N.S.) of the Panjab University** v. 10, p. 73-80, 1959.

SHARMA, N.; PARIDA, B. B. Study of chromosomes in spiders from Orissa. **Pranikee**, v. 8, p. 71-76, 1987.

SHYH-HWANG, C. Cytological studies on six species of spiders from Taiwan (Araneae: Theridiidae, Psecridae, Uloboridae, Oxyopidae, and Ctenidae). **Zoological Studies** 38:423–434, 1999.

SILVA, D. Species composition and community structure of peruvian rainforest spiders: A case study from a seasonally inundated forest along the Samiria river. **Revue Suisse de Zoologie**, hors série 1, p. 597-610, 1996.

SRIVASTAVA, M. D. L.; SHUKLA, S. Chromosome number and sex-determining mechanism in forty-seven species of Indian spiders. **Chromosome Information Service**, v. 41, p. 23-26, 1986.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

SUZUKI, Seisho; OKADA, Ainosuke. A study on the chromosomes of a spider, *Heteropoda Venatoria*, with special reference to X1-, X2-and X3-chromosomes. **Journal of science of the Hiroshima University Ser. B-1 Zoology**, v. 11, n. 4, p. 1-44, 1950.

SUZUKI, S. Cytological studies in spiders. III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. **Journal of Science of the Hiroshima University**, v. 15, p.23–136, 1954.

THALER, K. & KNOFLACH, B. **Fauna austriaca: Webspinnen-zur Einführung (Arachnida, Araneae)**. v. 12, v. 357-380, 2004.

TUGMON, C. R.; BROWN, J. D.; HORNER, N. V. Karyotypes of seventeen USA spiders species (Araneae, Araneidae, Gnaphosidae, Loxoscelidae, Lycosidae, Oxyopidae, Philodromidae, Salticidae and Theridiidae). **Journal of Arachnology**, v. 18, p. 41–48, 1990.

WAGNER, Jul. Einige Beobachtungen uber die Spermatogenese bei den Spinnen. **Zool Anz**, v. 19, p. 188-190, 1896.

WANG, Zhi; YAN, Hengmei. Technique of chromosome on spider blood cell. **Chinese Journal of Zoology**, v. 36, n. 3, p. 45-46, 2001.

WORLD SPIDER CATALOG, (2016). N.I, 2010. **The World Spider Catalog**. Version 11.0. American Museum of Natural History, New York, online at.

ZAMPAULO, Robson. A. Diversidade de invertebrados terrestres cavernícolas em nove cavidades naturais no município de Aurora do Tocantins –TO. Universidade Federal de Lavras. **Anais**. Minas Gerais. 2009.

ZHANG, Feng; ZHU, Ming-Sheng; SONG, Da-Xiang. A review of pholcid spiders from Tibet, China (Araneae, Pholcidae). **Journal of Arachnology**, v. 34, n. 1, p. 194- 205, 2006