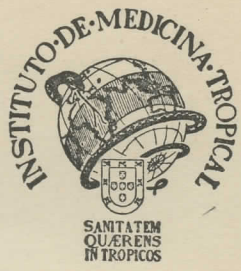


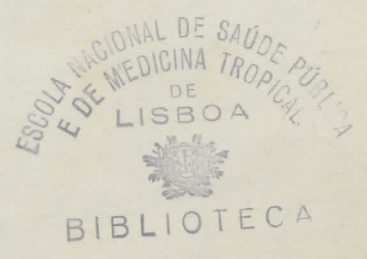
22
1



ENSAIOS SOBRE O ESTUDO DA NUMERAÇÃO
CROMOSÓMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE
MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE

J. FRAGA DE AZEVEDO e MARIA MARGARIDA GONÇALVES

Separata dos ANAIS DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL, Volume XIII, N.º 4
Dezembro de 1956



ENSAIOS SOBRE O ESTUDO DA NUMERAÇÃO
CROMOSÓMICA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE
MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE (1)

J. FRAGA DE AZEVEDO e MARIA MARGARIDA GONÇALVES

INTRODUÇÃO

Na sistemática de alguns moluscos gastropodos pulmonados, muitos deles hospedeiros intermediários de trematodos com interesse médico, há ainda pontos não completamente esclarecidos e que o simples estudo dos caracteres morfológicos dificilmente pode só por si resolver.

Transcrevemos a este respeito o que diz Max Perrot no seu trabalho intitulado: *Étude de Cytologie comparée chez les Gastéropodes Pulmonés* — «Em effet, beaucoup de caractères des genitalia employées en systématique (structure des glandes multifides, point d'insertion du muscle retracteur du pénis, longueur du flagelle, longueur du diverticule du canal receptacle):

- 1.º — peuvent être assez variables à l'intérieur d'une espèce;
- 2.º — présentent des aspects différents chez des espèces très voisines, dus certainement à des variations brusques de l'ordre des mutations».

Portanto, a numeração cromosómica, considerada uma característica da espécie, junta a outros caracteres citológicos pode ajudar a esclarecer este problema de tão grande interesse.

(1) Entregue para publicação em 21/11/56.

Com o fim de trazer uma contribuição à sistemática dos moluscos e ainda para ajudarmos a elucidar o interessante problema da constância somática e germinativa do número de cromosomas nas espécies animais realizamos este trabalho.

Começaremos por apresentar alguns aspectos preliminares sobre a questão.

MATERIAL E MÉTODOS

Propusemo-nos contar o número de cromosomas em alguns gastropodos pulmonados que ainda não foram estudados cariológicamente, escolhendo para este fim o *Australorbis glabratus olivaceus* (Spix) o *Planorbarius corneus* (Linn.) e o *Planorbarius metidjensis* (Forbes).

Todos os autores que se têm dedicado a este assunto tiveram o cuidado de empregar nos seus trabalhos moluscos colhidos da natureza e mortos rapidamente logo após a captura e nunca exemplares mantidos em cativeiro. Afirmam eles que os resultados obtidos com estes últimos são pouco elucidativos, visto a ovogénese e a espermatogénese não se fazerem activamente. Nós, infelizmente, só em parte tivemos oportunidade de trabalhar com material colhido nestas condições, incidindo a maior parte do estudo em espécies cultivadas no laboratório e mantidas tanto quanto possível em condições idênticas ao seu *habitat*.

Iniciámos o nosso estudo com o *Australorbis glabratus olivaceus*, fazendo as observações sobre a glândula hemafrodita — o ovotestis.

Num primeiro passo isolámos o ovotestis, procurando fazê-lo com o animal vivo, que para isso era tirado rapidamente da concha, partindo esta até à altura do músculo columelar e libertando-o de quaisquer fragmentos com o auxílio de uma pinça.

A seguir, com ele ainda vivo, separámos à lupa esterioscópica o ovotestis do hepatopâncreas, depois de o ter desembaraçado da membrana que o envolve, e mergulhámos o ovotestis rapidamente em fixador (este tempo tem de ser executado o mais rapidamente possível para evitar a alteração da glândula).

Como fixadores usámos os de Mann, de Flemming e de Zenker, tendo contudo abandonado este último, visto ocasionar imagens

extraordinariamente contraídas, não nos sendo possível observar sequer a estrutura do órgão.

Com o fixador de Mann usámos as seguintes colorações: hematoxilina férrica de Heidenhain, o método de Feulgen e a mistura hemalúmen — safranina — Orange G e com o Flemming também a hematoxilina férrica, o Feulgen e ainda o método de Mann e de Dobell. Obtivemos os melhores resultados talvez devido à pequenez dos cromosomas com a hematoxilina férrica, a coloração que actualmente empregamos quase exclusivamente.

Todos os desenhos foram executados à câmara clara com microscópio Zeiss-Opton com Optovar e ampliação de 2.000 a 3.000 diâmetros.

OBSERVAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Ao observarmos os primeiros cortes verificámos que ao lado de feixes de espermatozóides e de óvulos já maduros se encontravam outras células desde as nutridoras às células germinais, estas em diversos graus de desenvolvimento.

Quando iniciámos o nosso estudo tínhamos em mente servir-nos dos oócitos para neles realizarmos a contagem. Contudo, em face do avançado desenvolvimento em que se encontravam e ainda porque era difícil conseguir cortes em que os núcleos não fossem interceptados visto o diâmetro do núcleo dos oócitos no seu crescimento máximo oscilar à volta de 50 micra, decidimo-nos estudar a célula germinal masculina, mais favorável, pelas suas dimensões, ao emprego do método dos cortes. Pensámos, no entanto, realizar o mesmo estudo na célula feminina para o que teremos certamente de fazer cortes mais espessos do que os examinados até agora ou empregar o método de esmagamento, aliás já por nós ensaiado mas difícil de aplicar a este material e observar estados de desenvolvimento mais atrasados.

Fizemos os primeiros cortes com 7 micra mas depressa nos apercebemos de que esta espessura era insuficiente, pois não conseguimos encontrar um único espermatócito primário com o núcleo inteiro e, de facto, procedendo à medida do seu diâmetro verificámos que estava compreendido entre 7 a 8 micra. Passámos a fazer cortes com 10-12 micra e assim obtivemos um número razoável de núcleos inteiros em cada corte.

Os ovotestis do *A. glabratus olivaceus*, a espécie que primeiro estudámos, estavam uns numa fase de maturação muito avançada e outros em quiescência, encontrando-se sòmente uma ou outra célula a dividir-se. Interessava-nos poder seguir o desenvolvimento e a transformação das diversas células, desde a diferenciação, e acompanhar o seu crescimento até à maturação. Só vimos uma maneira de resolver o problema: seguir as posturas e isolar os indivíduos que fossem nascendo. Observando-os periòdicamente poderíamos encontrar a fase óptima de numeração que na maior parte dos gastropodos pulmonados é a de espermátócito primário e a de oócito.

Pudemos assim seguir a série espermática desde o início do crescimento até ao aparecimento da espermátide e do espermatozóide.

As células da linha espermática sofrem a meiose habitual desde a profase (passando pelos estados de leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno e diacinese) até à telofase de que mostramos aspectos na fig. 1.

No estado de paquiteno aparece a forma de bouquet, umas vezes só esboçado outras perfeitamente definido e orientado (Estampa II, c).

Ao lado de núcleos em estado de leptoteno, zigoteno, ou paquiteno típicos vêem-se por vezes outros em que estes diferentes estados se encontram misturados, podendo simultâneamente ser observados em um núcleo figuras representativas de cromosomas respeitantes a um ou mais destes estados. Na diacinese pudemos observar nos cromosomas bivalentes além dos quiasmas terminais que se encontram em todos, quiasmas intermediários em certos cromosomas. Até à diacinese o espermátócito primário aumenta de tamanho para estacionar ou mesmo diminuir um pouco da metafase em diante como é bem conhecido. Estes espermátócitos ao dividir-se dão origem a espermátócitos secundários bastante mais pequenos e que sofrem agora uma mitose típica, de que resultam espermátides e finalmente os espermatozóides.

Realizámos as contagens no espermátócito primário no estado de diacinese em que as tétRADAS muito bem definidas se dispõem à periferia, junto da membrana nuclear (Estampa H, e, f e g) e também na metafase vista de topo (Estampa H, h, i e j). Nesta última fase a contagem oferece maiores dificuldades em virtude dos cromosomas se encontrarem muito juntos no centro da célula ou mesmo coalescentes (provavelmente devido à fixação).

Tivemos sempre o cuidado de realizar as numerações em núcleos que nos pareceram perfeitamente intactos para não correremos o risco de deixar por numerar alguns cromosomas.

O número por nós encontrado nesta espécie, ou seja, no *A. glabratus olivaceus*, foi sempre 18, número haplóide.

Em meados de Janeiro iniciámos as nossas observações no *Pl. corneus* e no *Pl. metidjensis*.

Com o primeiro verificou-se um facto interessante e que está de acordo com o que certos autores dizem acerca dos exemplares mantidos em cativeiro. Assim, tivemos oportunidade de obter *Pl. corneus*, colhidos na natureza numa região da Beira Alta ao norte do país. Todos os exemplares que observámos estavam em franca reprodução, ao contrário do que acontecia com a mesma espécie mantida em aquários, nas quais só uma célula ou outra se encontrava em divisão. A iguais conclusões chegámos com nova remessa de moluscos da mesma proveniência, colhidos em Abril.

Fazendo o estudo dos exemplares recebidos em Janeiro e em Abril verificámos que nos primeiros a espermatogénese devia estar no início, pois que, embora se encontrassem já feixes de espermatozóides e óvulos maduros, podíamos ver uma grande quantidade de células em todas as fases, enquanto que nos últimos devia estar a atingir o fim, pois que os ácinos das glândulas estavam cheios de espermatozóides, havendo só uma pequena camada de células juntas à parede e já numa fase muito avançada de desenvolvimento.

Os exemplares colhidos na Beira Alta uma vez postos no aquário passaram a comportar-se, no que respeita à espermatogénese, como os que lá existiam. Verifica-se, pois, que o melhor material para um estudo destes é aquele que é colhido da natureza porque apresenta uma maior actividade reprodutora, mostrando o ovotestis maior número de células em divisão.

No *Pl. corneus*, tanto quanto observámos até agora, a meiose passa-se de uma maneira semelhante à do *A. glabratus*, como se pode ver nas figuras do Quadro II.

Fizemos as numerações também na profase no estado de diacinese (Estampa III, d, e, f e g) e na metafase vista do topo (Estampa III, h, i e j) dos espermatócitos primários, rodeando-nos dos mesmos cuidados que tivemos com o *A. glabratus*, de que já atrás falámos.

Em todos os *Planorbarius corneus* observados encontrámos o número 17 (haplóide).

Com o *Pl. metidjensis* não chegámos ainda a quaisquer conclusões em virtude de termos de interromper as observações por falta de material; esperamos, contudo, continuar em breve.

DISCUSSÃO

Em todas as nossas observações encontrámos sempre o mesmo número haplóide de cromosomas, 18 para o *Australorbis glabratus olivaceus* e 17 para o *Planorbarius corneus*.

Desde as observações de Stresburquer, Fol, Boveri e outros é facto assente que o número de cromosomas se encontra praticamente constante dentro de cada espécie nas células germinais. Esta lei da constância numérica dos cromosomas deu origem a inúmeras controvérsias, havendo autores que a negaram ao lado de outros que a consideraram uma das características da espécie.

Num estudo desta natureza não admira os resultados discordantes que por vezes alguns autores encontram, se nos lembrarmos que os cromosomas pelas suas pequeníssimas dimensões, estão sujeitos a variadas causas de erro desde a fixação à observação microscópica.

Alguns autores fizeram incidir as suas observações sobre as células somáticas mas estas nem sempre constituem bom terreno para este estudo visto poderem estar alteradas e portanto o processo de divisão não ser a mitose típica, dando como resultado o aparecimento de células filhas com número de cromosomas diferentes. Já o mesmo se não verifica nas células germinais cujo processo de divisão, a meiose, se produz sempre da mesma maneira. Por outro lado, a falta de constância numérica dos cromosomas somáticos, pode não corresponder à da linha germinal.

Nesta, os cromosomas encontram-se em regra em número constante para uma dada espécie. É certo que há como é bem sabido uma variação do número de cromosomas dentro da espécie constituindo as chamadas mutações numéricas de cromosomas. Contudo, o número característico da espécie tende a manter-se constante.

Nós, como atrás referimos, encontrámos sempre o mesmo número. No entanto, não temos tantas observações quantas desejávamos,

embora tivéssemos feito já um número razoável de leituras e, além disso, o material bom é difícil de obter; por este motivo as observações feitas são apresentadas com todas as reservas.

CONCLUSÕES

Pelo que pudemos observar, pensamos que o número haplóide de cromosomas do *Australorbis glabratus olivaceus* é 18 e o do *Planorbarius corneus* é 17, números estes que nos parecem constantes. Estas observações terão, todavia, de ser completadas pelos resultados dos trabalhos que ainda temos em curso.

Agradecimento: Ao Ex.^{mo} Sr. Prof. J. A. Serra agradecemos a boa colaboração que nos prestou e à Sr.^a D. Manuela Ottolini manifestamos o maior apreço pelos desenhos que ilustram o presente trabalho.

RESUMO

A sistemática dos moluscos firmada nos caracteres morfológicos externos e internos (sendo dentre os últimos com maior interesse os fornecidos pelo estudo da genitália), oferece, ainda bastantes dificuldades pelo que se torna necessário recorrer a outros elementos de classificação.

Como está provado que o número de cromosomas é constante dentro de dada espécie, este dado, junto a outros elementos de ordem citológica, poderá ajudar a resolver o problema.

Com este fim propusemo-nos contar o número de cromosomas em alguns Gasteropodos pulmonados, iniciando o nosso estudo com *Australorbis glabratus olivaceus*, *Planorbarius corneus* e *Planorbarius metidjensis* cujos resultados são apresentados.

RÉSUMÉ

La classification systématique des mollusques basée sur les caractères morphologiques externes et internes (étant parmi les derniers ceux que avec plus d'intérêt sont fournis par l'étude de la génitale), offre encore assez des difficultés et on a donc besoin de recourir à d'autres éléments de classification.

Comme il est déjà prouvé que c'est constant le nombre de chromosomes chez une certaine espèce, cette donnée, avec d'autres éléments d'ordre cytologique, pourra aider à résoudre le problème.

Dans ce but nous nous proposons de compter le nombre de chromosomes chez quelques Gastropoda Pulmonata, en commençant notre étude avec *Australorbis glabratus olivaceus*, *Planorbarius corneus* et *Planorbarius metidjensis* dont les résultats sont présentés.

SUMMARY

The systematic of the molluscs based upon morphological characters, external and internal ones (being among the latter with the most interest the characters furnished by the study of the genitalia), still offers sufficient difficulties so that it is necessary to resort to other elements of classification.

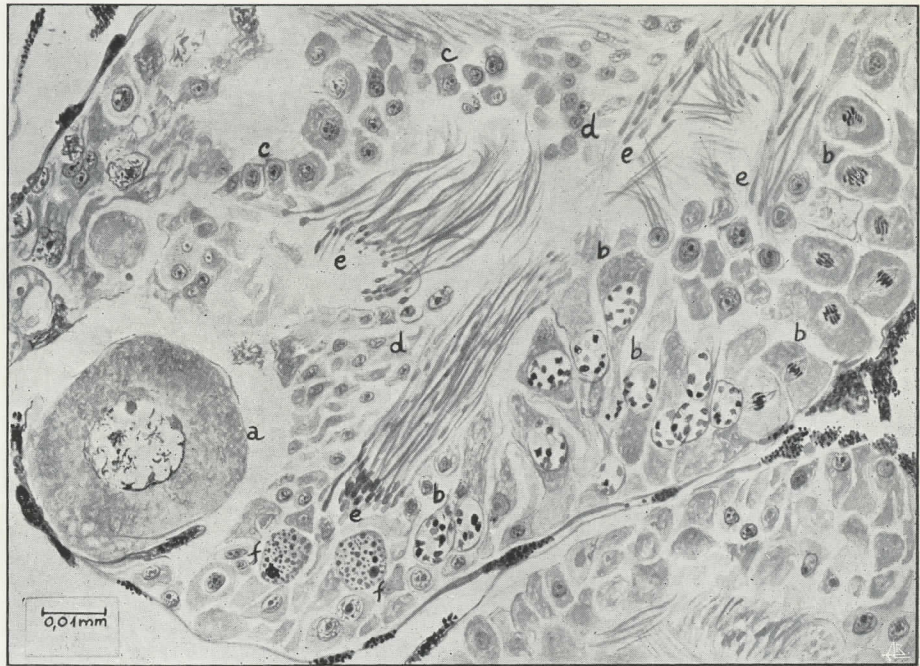
As it is proved that the number of chromosomes is constant among the same species, this data, together with other elements of cytological order, might be of help to resolve the problem.

With this end in view we propose to count the number of chromosomes in some Gastropoda Pulmonata, beginning our study with *Australorbis glabratus olivaceus*, *Planorbarius corneus* and *Planorbarius metidjensi* the results of which are presented.

BIBLIOGRAFIA

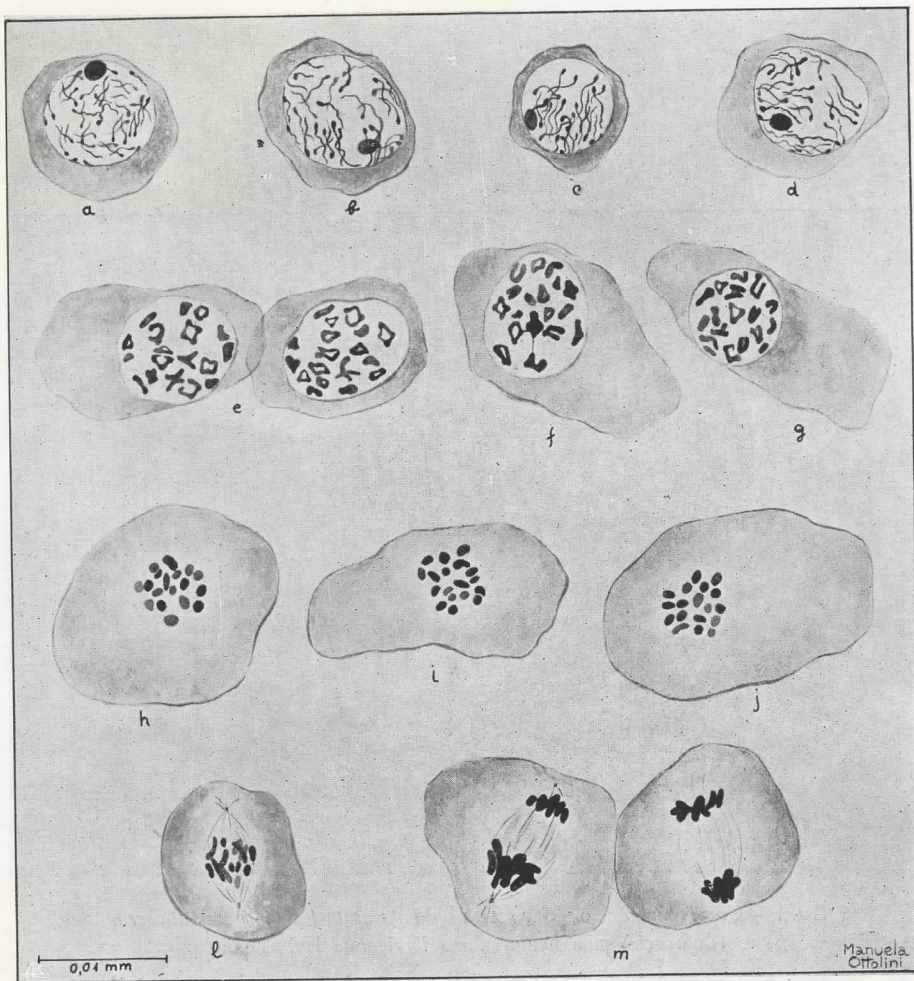
- CRABB, ED. D. — The fertilization process in the snail, *Lymnaea stagnalis appressa* Say — Biol. Bull., 53: 67-108, 1927.
- LINVILLE, H. R. — Maturation and fertilization in Pulmonate Gasteropods — Bull. Mus. Comp. Zoöl., Harvard, 35: 8, 211-248, 1900.
- PERROT, JEAN-LOUIS — Chromosomes et Hétérochromosomes chez les Gastéropodes pulmonés — Rev. Suisse Zool., 37: 20, 397, 1930.
- PERROT, MAX — Étude de Cytologie comparée chez les Gastéropodes Pulmonés — Rev. Suisse Zool., 45: 20, 487-558, 1938.
- HUSTED, Prof. L.; BURCH, Prof. P. R. — The chromosomes of polygyrid snails — The American Naturalist, 80: 793, 410-428, 1946.
- BOLLES LEE, A. — La réduction numérique et la conjugaison des chromosomes chez l'escargot — La cellule, 27: 54-72, 1911.
- ANCEL, P. — Sur les premières différenciations cellulaires dans la glande hermaphrodite d'*Helix pomatia* — Bibliog. Anat., 11: 1, 17-20, 1902.
- PERROT, JEAN-LOUIS — A propos du nombre des chromosomes dans les 2 lignées germinales du Gastéropode hermaphrodite *Limnaea stagnalis* (variété *rhodani*) — Rev. Suisse Zool., 41: 39, 693-697, 1934.
- NAVILLE, A. — Recherches sur la constance numérique des Chromosomes dans la lignée germinale mâle de *Helix pomatia* L. — Rev. Suisse Zool., 30: 14, 353-380, 1923.
- BAUMGARTNER, W. J. — Some new evidences for the individuality of the chromosomes. — Biol. Bull., 8: 1, 1-23, 1904.
- RICHARDS, A. — The history of the chromosomal vesicles in *Fundulus* and the theory of the genetic continuity of chromosomes — Biol. Bull., 32: 249-284, 1917.

- RICHARDS, A. — Maturation, fecundation and segmentation of *Limax campestris* Binney — Bull. Mus. Comp. Zool., Harvard, 6: 173-625.
- MAKINO, SAJIRO — Chromosome numbers in Animals. Iowa, 1951.
- PERROT, J. L. et PERROT, MAX — La formule chromosomique chez l'*Helix pomatia* — Rev. Suisse Zool., 44: 1937.
- PERROT, J. L. et PERROT, MAX — Sur les chromosomes du genre *Helix* (note) — C. R. Acad. Sci., 207, 1938.
- LARAMBERGUE, M. M. DE — Étude cytologique de l'autofécondation chez *Limnaea auricularia* L. (nota) — C. R. Acad. Sci., 2: 189, 189, 1929.



Est. I — Corte dum ácino do ovotestis de *Australorbis glabratus olivaceus*
(Coloração pela hematoxilina férrica de Heidenhain)

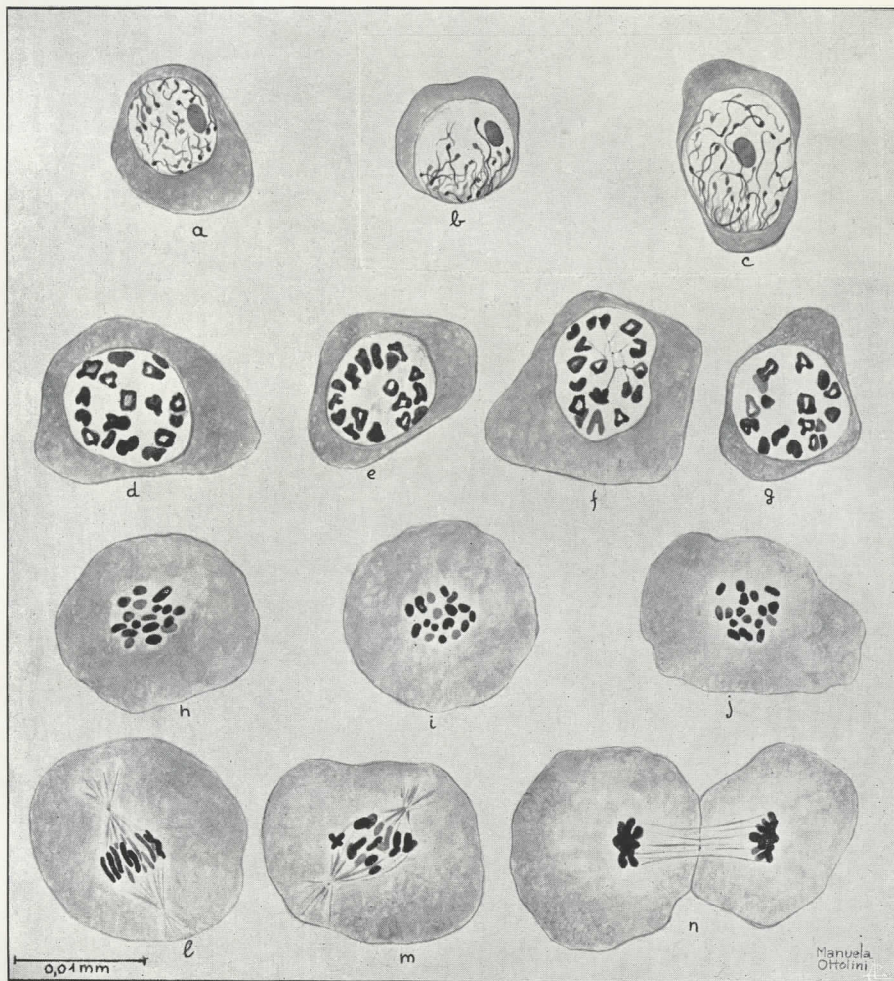
a) — oócito; *b)* — espermatócitos primários em diversas fases; *c)* — espermatócitos secundários; *d)* — feixes de espermatozóides; *e)* — células nutridoras.



Est. II — Espermatócitos primários do *Australorbis glabratus olivaceus* em diversas fases meióticas (coloração pela hematoxilina férrica de Heidenhain)

- a) — Leptoteno
- b) — Zigoteno
- c) — Bouquet
- d) — Paquiteno
- e) {
- f) { Diacinese
- g) }

- h) {
- i) { Metáfase de topo
- j) {
- l — Anáfase
- m — Telófase



Est. III — Espermatócitos primários do *Planorbarius corneus* em diversas fases meióticas
(coloração pela hematoxilina férrica de Heidenhain)

- | | | |
|-------------------------|-----|------------------|
| a) — Leptoteno | h { | Metáfase do topo |
| b) — Bouquet | i { | |
| c) — Zigoteno-Paquiteno | j { | Anáfase |
| d) { | l { | |
| e) } Diacinese | m { | Telefase |
| f) } | n — | |
| g) } | | |

Imprensa Portuguesa ★ Rua Formosa, 108-116 ★ PORTO