

Embriologia

Toshie Kawano

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

BARBOSA, FS., org. *Tópicos em malacologia médica* [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. 314 p. ISBN 85-85676-13-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Embriologia

3.1 Embriologia

INTRODUÇÃO

O conceito tradicional que define a **embriologia** é o estudo de embriões. A embriologia estuda o desenvolvimento de uma célula que é um ovo fertilizado, até se tornar um organismo pronto para eclosão como no caso dos moluscos.

Durante o desenvolvimento embrionário, a diversidade celular é determinada através da diferenciação, enquanto o processo da morfogênese é o que organiza diferentes células em tecidos e órgãos, e o crescimento é o aumento em tamanho e número celular. A segunda maior função no desenvolvimento é a reprodução, isto é, a geração de novos indivíduos.

O ovo inicialmente sofre diversas clivagens (formando células denominadas de blastômeros), até alcançar um estágio de **blástula** onde, até então, somente ocorrem mitoses sem aumento de volume celular. No estágio seguinte de **gástrula**, ocorre início da movimentação celular. Na gastrulação o embrião contém três camadas celulares: a ectoderme, mesoderme e endoderme. Na etapa seguinte de Organogênese, as células interagem e formam os órgãos. Há um grupo de células que são precursoras dos gametas, as células germinativas, responsáveis pela função reprodutora. Por outro lado, todas as outras células são denominadas de somáticas. As células germinativas migram para as gônadas e se diferenciam em gametas. O processo de desenvolvimento dos gametas se chama gametogênese e se completa, quando o organismo se torna fisicamente maduro (Scott, 1994).

A embriologia atualmente faz parte de um ramo da Biologia do Desenvolvimento.

O estudo da embriologia normal de um organismo como a *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae), se torna importante em razão de se poder comparar o embrião normal com o malformado, já que é um organismo extremamente utilizado em experimentos com diferentes substâncias químicas ou de origem vegetal, para o seu controle na natureza.

MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO DO OVO: ASPECTO EXTERNO

Nos moluscos, em geral, a maturação do ovócito inicia-se independentemente da fertilização e fica bloqueada na metáfase da primeira divisão meiótica (Raven, 1958), continuando o desenvolvimento normal após a fertilização.

Os eventos da fertilização nos ovos de clivagem em espiral incluem três etapas (Longo, 1976):

- a) Incorporação do espermatozoide e desenvolvimento do pronúcleo masculino com bloqueio da polispermia.
- b) Reinício da meiose do ovócito: quebra da vesícula germinal, formação do primeiro e segundo corpúsculo polar e desenvolvimento do pronúcleo feminino.
- c) A associação do pronúcleo masculino e feminino, formação do genoma embriônico e início da mitose.

Logo após a oviposição, tanto em *Limnaea stagnalis* L. como em *Biomphalaria glabrata* (Say), a desova apresenta-se com a cápsula externa maleável e com a substância albuminosa opaca. Após alguns minutos, a cápsula torna-se mais rígida e a desova transparente.

A emissão do primeiro corpúsculo polar, ocorre de 15 a 30 minutos após a oviposição; cerca de 50 a 80 minutos depois, o segundo corpúsculo é expulso. Ambos podem permanecer um sobre o outro ou lado a lado, na região do pólo animal do ovo.

Em *L. stagnalis*, Raven (1945), e *B. glabrata*, Comey (1968), a emissão dos corpúsculos polares é seguida de movimentos amebóides do ovo que acompanham as divisões de maturação. O contorno do ovo se torna irregular e um processo pseudopodado é formado, acarretando a sua deformação.

O pronúcleo feminino e o masculino se unem formando o genoma do embrião que estará apto a iniciar o ciclo da mitose, em períodos que variam de 60 (*B. glabrata*) a 100-110 minutos (*L. stagnalis*), após a emissão do segundo corpúsculo.

Clivagem em espiral ou determinativa

Com exceção dos cefalópodos, os moluscos apresentam clivagem espiral (helicoidal) ou determinativa; assim é possível traçar o destino de cada blastômero, desde as primeiras clivagens do ovo.

Nos moluscos de clivagem em espiral, determinantes morfogenéticos situados no pólo vegetativo em ovos indivisos, desempenham um papel importante, estabelecendo a organização primordial do futuro embrião. Tais determinantes podem estar localizados em estruturas citoplasmáticas especiais ou estariam ligados no córtex da região vegetativa do ovo e serem distribuídos para certos blastômeros,

determinando o destino dos mesmos (Verdonk & Cather, 1983). Os determinantes parecem ser sintetizados e armazenados durante a ovogênese; sua natureza, entretanto, ainda é discutível (Boon-Niermeijer, 1987).

Desde o final do século passado vários pesquisadores realizaram trabalhos em linhagens celulares com diferentes espécies de moluscos. Raven (1958) referiu-se aos estudos de Blochman (1882) com *Neritina fluviatilis*; de Heymons (1893) com *Umbrella mediterranea*; de Lillie (1895) com Unionidae; de Kofoid (1895) com *Limax* sp.; de Meisenheimer (1896 e 1901) com *Limax maximus* e *Dreissensia polymorpha*; de Conklin (1897 e 1907) com *Crepidula* sp. e *Fulgur* sp.; de Heath (1899) com *Ischnochiton* sp.; de Holmes (1900) com *Planorbis trivolvis*; de Robert (1902) com *Trochus* sp.; de Casteel (1904) com *Fiona marina*; de Carazzi (1905) com *Aplysia* sp.; de Wierzejski (1905) com *Physa fontinalis*; de Delsman (1912) com *Littorina obtusata*. Mais recentemente trabalhos como de Verdonk (1965) com *Limnaea stagnalis*; de Camey e Verdonk (1970) com *B. glabrata* e de Van Dongen (1976) com *Dentalium* foram descritos.

A abordagem da embriologia neste item será realizada, principalmente, com espécies de moluscos de interesse médico. As espécies estudadas comparativamente são a *Limnaea stagnalis* (hospedeira intermediária da *Fasciola hepatica*) e *Biomphalaria glabrata* (hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*). A *L. stagnalis* é um exemplo de clivagem padrão ou dextrorsa (Verdonk, 1965) e a *B. glabrata* é do tipo reversa ou sinistrorsa (Camey, 1968).

Nomenclatura e nota

A nomenclatura e a notação são padronizadas para o estudo da linhagem celular, o que é essencial para o acompanhamento das etapas sucessivas do desenvolvimento embrionário, bem como do estudo comparativo entre as diferentes espécies.

A nomenclatura e notação utilizadas neste trabalho são as mesmas adotadas por Verdonk (1965) para o estudo de *L. stagnalis* e anteriormente estabelecidas Conklin (1897) para o estudo de linhagem celular de *Crepidula*.

A clivagem em espiral se caracteriza pela orientação do fuso na divisão dos blastômeros que é oblíqua e alternante: oblíqua, em relação a um eixo que passa pelo pólo animal e vegetativo (Wilson, 1892 *apud* Raven, 1958) e alternante pela mudança alternada da direção do fuso a cada divisão sucessiva dos blastômeros, do sentido horário para o anti-horário, por uma rotação de 45° em torno do eixo vertical do ovo (Kofoid 1895, *apud* Raven, 1958).

A notação para designação das gerações sucessivas de micrômeros consiste de uma letra, um coeficiente e um expoente. A letra indica a origem de um micrômero. O coeficiente indica o número da camada do micrômero e o expoente indica o número de gerações. O termo quarteto foi adotado por Conklin (1897) *apud* Raven (1958) para designar os quatro blastômeros e sua descendência que se originam da clivagem dos quatro macrômeros iniciais. O hífen, nesse caso, é utilizado para simbolizar os quatros blastômeros pertencentes a um quarteto, ou seja: $1a^1 - 1d^1 = a 1a^1, 1b^1, 1c^1$ e $1d^1$. O primeiro quarteto de micrômeros que se forma na terceira clivagem do ovo terá a seguinte notação $1a - 1d$ (Figura 2-3). Estes micrômeros, por sua vez, darão posteriormente a geração $1a^1 - 1d^1$ e $1a^2 - 1d^2$ (Figura 2-5). Na geração seguinte o $1a^1 - 1d^1$ dará origem a $1a^{11} - 1d^{11}$ e $1a^{12} - 1d^{12}$ (Figura 2-11). O quarteto $1a^2 - 1d^2$ dará: $1a^{21} - 1d^{21}$ e $1a^{22} - 1d^{22}$ (Figura 2-12) e assim por diante.

Após uma clivagem o blastômero que se aloja à direita e na parte superior, ou seja, na direção do pólo animal, leva o expoente 1; o expoente 2, portanto, será daquele que se localiza à esquerda e próximo ao pólo vegetativo do embrião. Quando, entretanto, a clivagem é bilateral, utiliza-se o expoente 1 para o blastômero situado à direita e o 2 para o da esquerda.

Para distinguir se o tipo de clivagem é dextrorsa ou sinistrorsa, leva-se em conta a orientação do fuso de divisão. Quando o fuso de divisão estiver no sentido oblíquo em relação ao eixo do ovo e no sentido horário, a clivagem é dextrorsa e quando no sentido anti-horário, sinistrorsa. Quando se observa o ovo do pólo animal, considera-se a clivagem dextrorsa se o quarteto superior se encontra à direita do inferior, do qual se originou e sinistrorsa se o quarteto superior se encontra à esquerda.

A notação para os macrômeros foi utilizada segundo Wierzejski (1905). Esta consiste em alterar a numeração do macrômero, de acordo com separação de um quarteto de micrômeros. Com a origem do primeiro quarteto de micrômeros $1a-1d$, os macrômeros A-D são designados $1A-1D$ (Figura 2-3). Após a clivagem do segundo quarteto de micrômeros $2a-2d$, os macrômeros passam a ser designados de $2A-2D$ (Figura 2-4). Assim, na formação do quarteto de micrômeros $3a-3d$, os macrômeros passam a ser $3A-3D$, (Figura 2-7). Na clivagem do quarto quarteto de micrômeros $4a-4d$, os macrômeros passam a ser $4A-4D$ (Figura 2-10). Finalmente, com a formação da quinta geração de micrômeros $5a-5c$, os macrômeros são denominados $5A-5C$ (Figura 2-18).

A descrição da linhagem celular das duas espécies será feita concomitantemente, já que o padrão de clivagem de *B. glabrata* é a imagem especular do padrão de *L. stagnalis*. No decorrer da descrição, só será feita uma observação quando a clivagem em *L. stagnalis* for diferente.

Técnica de coloração do limite celular

Até o estágio de 12 blastômeros foi observado *in vivo*, porém nos estádios posteriores foi utilizado o método de Holmes (1900 *apud* Verdonk, 1965) que estudou em *Planorbis trivolvis* e em *Lymnaea stagnalis*, Verdonk (1965), e mais tarde em *Biomphalaria glabrata*, Camey e Verdonk (1970).

Os ovos foram removidos de suas cápsulas, com um auxílio de duas pinças de extremidades bem agudas, dentro de uma saleirinha contendo água destilada. Com uma pipeta *braking* foram transferidos para uma outra saleirinha contendo água destilada removendo assim a substância gelatinosa. Em seguida foram transferidos para uma saleirinha contendo 0,75% de AgNO₃ e expostas ao U.V. por alguns minutos, até o limite celular se tornar nítido (microscópio estereoscópio). Os ovos então foram lavados com água destilada, transferidos em diferentes alcoóis: 50%, 70%, 80%, 96% (\pm 10 horas cada), 100% (3x20 minutos e no xylol (três banhos). Os ovos foram montados individualmente em bálsamo entre uma lamínula colada de um dos lados em cartolina (mesma área da lamínula, porém recortada na sua parte central em forma circular) de modo que os ovos possam permanecer inteiros sem o contato direto entre a lâmina e a lamínula. Após a montagem, os ovos foram movimentados e observados de todos os lados pelo deslocamento da lamínula. No caso do bálsamo endurecer, poderá ser gotejado xylol na extremidade da lamínula para facilitar a movimentação da mesma.

Primeiras clivagens: Antes da primeira clivagem

O diâmetro do ovo maduro é cerca de 100 μ para *B. glabrata* (Camey, 1968) e 120 μ para *L. stagnalis* (Raven, 1958).

Na Figura 1-1A observa-se o estágio do ovo antes da primeira clivagem, com o pólo animal e os dois corpúsculos polares.

Primeira clivagem

Todos os estádios de primeiras clivagens (primeira até quarta) foram fotografadas *in vivo*, em intervalos de 2 a 5 minutos, em *B. glabrata* (Kawano et al., 1992); estes estádios são semelhantes os de *L. stagnalis* (Raven, 1946).

Durante todo o desenvolvimento embrionário, as desovas foram mantidas a uma temperatura de 25° C.

No estágio 1B (Figura 1-1B) verifica-se o aparecimento do sulco da primeira clivagem do ovo, na região do pólo animal. Para qualquer contagem na idade do

embrião, este estágio 1B (quando 50% de embriões de uma mesma desova atingem este estágio) é o ponto de partida do desenvolvimento, pois dentro de uma mesma desova o desenvolvimento inicial não é sincrônico em todos os embriões.

No estágio 2 (Figura 1-2) o sulco se apresenta mais profundo; observa-se que a região do pólo animal se cliva mais rapidamente que a do pólo vegetativo, 3 minutos após o estágio 1B.

No estágio 3 (Figura 1-3) o sulco do pólo animal se apresenta mais profundo que o do pólo vegetativo, 4 minutos.

No estágio 4 (Figura 1-4), observa-se o afastamento máximo dos dois blastômeros, ambos com a superfície bem arredondada, ligados somente com uma pequena superfície citoplasmática, 10 minutos.

A partir do estágio 5 (Figura 1-5) (20 minutos) há aproximação dos blastômeros, aumentando a superfície de contato; os estágios 6 (26 minutos) e 7 (38 minutos) (Figuras 1-6 e 7) possuem os limites dos blastômeros pouco nítidos.

No estágio 8 (Figura 1-8) (45 minutos) observa-se o aparecimento bem discreto da cavidade de clivagem entre os dois blastômeros. Esta cavidade aumenta de tamanho e atinge toda superfície de contato dos dois blastômeros, no estágio 9 (Figura 1-9) (75 minutos). Após este estágio, a cavidade de clivagem se abre e o seu conteúdo flui para o exterior.

Segunda clivagem

O estágio 10 (Figura 1-10), ou o início da segunda clivagem, ocorre 80 minutos após a primeira clivagem do ovo.

Neste estágio, os blastômeros não se dividem simultaneamente; o sulco de clivagem de um dos blastômeros surge antes do outro, apresentando o aspecto bilobado, enquanto o outro se apresenta inteiro. O sulco de clivagem é total e meridional. No estágio 11 (91 minutos), nota-se que os quatro blastômeros A, B, C e D são arredondados, mas não se encontram no mesmo plano (Figura 1-11). O blastômero A e C estão ligados pelo sulco do pólo animal, enquanto o B e D pelo sulco polar vegetativo. No estágio 12 (98 minutos) observa-se o início do achatamento dos blastômeros e os dois blastômeros opostos se apresentam unidos com maior visibilidade.

Nos estágios que se seguem, 13 (103 minutos) e 14 (123 minutos) (Figuras 1-13 e 14), há o aparecimento da cavidade de clivagem entre os blastômeros. Esta cavidade começa a alargar até se abrir para o exterior expelindo o fluido, o que é acompanhado de uma contração de todo o ovo (Figura 1-15) (134 minutos).

Terceira clivagem

O embrião atinge este estágio 16 (Figura 1-16) cerca de 160 minutos após a primeira clivagem. A terceira clivagem é no sentido subequatorial; os quatro micrômeros (1a-1d) nunca jazem sobre os macrômeros, mas sobre os sulcos formados por eles; assim a *B. glabrata* possui a orientação dos micrômeros no sentido anti-horário.

O micrômero 1a está em conexão com o 1c, no pólo animal, enquanto os macrômeros 1B e 1D se ligam no pólo vegetativo.

Quando o micrômero atinge o estágio 17 (Figura 1-17) (165 minutos), observa-se arredondamento máximo dos blastômeros, em seguida, nos estádios 18 (173 minutos) e 19 (181 minutos) (Figuras 1-18 e 19) ocorre o aumento da cavidade de clivagem entre os blastômeros.

Quarta clivagem

A quarta clivagem ocorre 3 horas e 50 minutos após a primeira clivagem do ovo (Figura 1-20). O segundo quarteto de micrômeros se separa dos macrômeros no sentido sinistrorso (Figura 2-4), atingindo o estágio de 12 blastômeros.

Estádio de 12 a 24 blastômeros

O primeiro quarteto de ectômeros (1a-1d) é o próximo a clivar, aproximadamente cinco horas após a primeira clivagem. Esta clivagem é dextrorsa e o embrião possui 16 células (Figura 2-5).

Cerca de 6 horas após a primeira clivagem, ocorrem quase simultaneamente a clivagem do segundo quarteto de micrômeros (2a-2d) e a formação do terceiro quarteto de micrômeros (3a-3d) (Figura 2-6).

Terminadas estas clivagens, que são no sentido sinistrorso, o embrião atinge o estágio de 24 blastômeros. Neste estágio, os quatro macrômeros são aparentemente menores que quatro micrômeros, provavelmente porque apresentam ao observador apenas uma parte reduzida de sua superfície externa. O macrômero 3D apresenta-se com o contorno arredondado (Figura 2-7), diferenciando-se dos demais três macrômeros.

A semelhança de *Planorbis trinolvis*, *Physa fontinalis* e *L. stagnalis*, o estágio de 24 células em *B. glabrata* também é um período de "repouso", cuja duração média é de 3 horas.

Estádio de 24 a 45 blastômeros

O período de "repouso" termina quando o macrômero 3D se divide, dando origem ao mesoblasto primário M (4d). Com esta clivagem, o embrião atinge 25 blastômeros, cerca de 9 horas após a primeira clivagem do ovo. Ela determina, pela primeira vez, a simetria bilateral do embrião (Figura 2-8).

Para se entender a relação entre a posição dos quadrantes e o eixo do futuro embrião, deve-se levar em conta a clivagem reversa de *B. glabrata*.

A posição de 4d (M) e o eixo animal-vegetativo determinam o plano mediano de simetria do futuro embrião; a célula 4d indica a posição dorsal. Assim, o segundo (2a - 2d) e o quarto (4a - 4d) quartetos de micrômeros são formados no sentido dextrorso, encontrando-se em posição radial (A = direita, B = ventral, C = esquerda e D = dorsal), Figura 2-10. A geração do terceiro quarteto de micrômeros se origina no sentido sinistrorso, localizando-se na posição inter-radial (A = direita ventral, B = esquerda ventral, C = esquerda dorsal e D = direita dorsal) (Figura 2-10). Porém na clivagem seguinte, que é sinistrorsa em *L. stagnalis* e dextrorsa para *B. glabrata*, as células filhas $1a^2 - 1d^2$ irão se situar na posição inter-radial, enquanto que $1a^1 - 1d^1$ se dispõem no sentido radial (Figura 2-9).

Cerca de 10 horas após a primeira clivagem, a camada superior e inferior do segundo quarteto de micrômeros, respectivamente $2a^1 - 2d^1$ e $2a^2 - 2d^2$ sofrerão as próximas clivagens no sentido dextrorso em *B. glabrata* (Figura 2-9), atingindo, desta maneira, o estágio de 33 blastômeros.

Nesse estágio, formam-se as células terminais $2a^{11} - 2d^{11}$ que tomam parte na formação da cruz observada em *B. glabrata* (Figura 2-11). O estágio de cruz tem sido descrito em Anelídeos e Moluscos (exceto cefalópodos) como sendo um dos estádios mais característicos durante o desenvolvimento embrionário destes animais. Nos moluscos, a cruz constituída por blastômeros que formarão quase toda a região cefálica.

Aproximadamente 11 horas após a primeira clivagem do ovo, o terceiro quarteto de micrômeros se cliva no sentido dextrorso. Em seguida, os macrômeros 3A, 3B e 3C se clivam formando a quarta geração de micrômeros (4a, 4b, e 4c), em direção ligeiramente dextrorsa, atingindo 40 blastômeros.

No pólo animal, a camada superior do primeiro quarteto de ectômeros ($1a^1 - 1d^1$) se cliva no sentido sinistrorso. Neste período se destaca, pela primeira vez, o inconfundível estágio de cruz (Figura 2-11). As quatro células externas do primeiro quarteto de micrômeros $1a^{12} - 1d^{12}$ são as bases do braço da cruz, situando-se radialmente na direção das células terminais $2a^{11} - 2d^{11}$, enquanto que as células apicais $1a^{11} - 1d^{11}$ formam o centro da cruz, na posição inter-radial.

Em *L. stagnalis*, Biggelaar (1971) observou que o blastômero 1d1 se divide 30 minutos após os outros três (1a¹, 1b¹ e 1c¹); nesta espécie, portanto, a simetria bilateral (pólo animal) inicia-se a partir deste estágio. Este mesmo autor constatou que em condições experimentais com LiCl em embriões, ocorreu a sincronia na clivagem deste quarteto 1a¹ - 1d¹ e a posterior formação da exogástrula. Esta observação foi de grande importância, pois chegou-se à conclusão de que a simetriabilateral no pólo animal é induzida na estágio de 24 blastômeros e está associada ao processo de gastrulação.

Os blastômeros do segundo quarteto de micrômeros 2a¹¹ - 2d¹¹ são os que constituem as células terminais dos braços da cruz.

Cerca de 12 horas após a primeira clivagem do ovo, segue-se a clivagem do mesoblasto primário, no sentido meridional, resultando nos blastômeros M₁ e M₂ (Figura 2-10). Como estas duas células são do mesmo tamanho, o embrião apresenta um aspecto característico na sua parte dorsal. Na Figura 2-11 um embrião com 45 células visto pelo pólo animal. Na Figura 2-10 o mesmo embrião é visto pelo pólo vegetativo.

Um embrião com 45 blastômeros tem a seguinte constituição:

Células do primeiro quarteto:

1a¹¹ - 1d¹¹

1a¹² - 1d¹²

1a² - 1d²

Células do segundo quarteto:

2a¹¹ - 2d¹¹

2a¹² - 2d¹²

2a²¹ - 2d²¹

2a²² - 2d²²

Células do terceiro quarteto:

3a¹ - 3d¹

3a² - 3d²

Células do quarto quarteto:2 mesômeros M_1 e M_2

3 endômeros 4a - 4c

Macrômeros: 4A - 4D

O DESENVOLVIMENTO DO PRIMEIRO QUARTETO DE MICRÔMEROS**Estádio de cruz**

A Figura 3 ilustra o desenvolvimento do primeiro quarteto de micrômeros, a partir do ovo. A figura em cruz se torna visível pela primeira vez, quando o embrião atinge o estágio de 45 blastômeros (Figura 2-11). O quarteto de micrômeros apicais $1a^{11}$ - $1d^{11}$ jazem no centro da cruz, enquanto os braços são formados pelas células basais $1a^{12}$ - $1d^{12}$. As células terminais são constituídas pelos micrômeros do segundo quarteto $2a^{11}$ - $2d^{11}$.

O próximo quarteto a se clivar é o trocoblato primário $1a^2$ - $1d^2$, cerca de 13 horas após a primeira clivagem. As oito células ($1a^{21}$ - $1d^{21}$ e $1a^{22}$ - $1d^{22}$) secundárias ou trocoblato definitivo, nunca se dividem, localizando-se nos ângulos entre os braços da cruz.

Formada a cruz, durante três horas não se observam divisões celulares nesta região. Modifica-se, porém, o aspecto da cruz, em razão da penetração das células ($1a^{11}$ - $1d^{11}$) no interior do embrião (Figura 2-12). Em seguida as células basais $1a^{12}$ - $1d^{12}$ começam a se clivar, contando o embrião com cerca de 76 blastômeros, cerca de 16 horas após a primeira clivagem.

Na Figura 2-14 um embrião com 83 blastômeros se apresenta com todas as células basais divididas. A direção da clivagem é ligeiramente sinistrorsa.

As células medianas externas $1a^{122}$ - $1d^{122}$ se localizam entre as células terminais $2a^{11}$ - $2d^{11}$ e as células basais $1a^{121}$ - $1d^{121}$. Com exceção da célula mediana do braço ventral $1b^{122}$, as células medianas externas dos outros braços não mais se dividem no estágio larvário (Figura 2-25).

A divisão seguinte ocorre nas células apicais do primeiro quarteto de micrômeros $1a^{11}$ - $1d^{11}$, no sentido dextrorso (centro da cruz).

A partir desta divisão forma-se a roseta apical $1a^{111}$ - $1d^{111}$, cercando o pólo animal do embrião e a roseta periférica $1a^{112}$ - $1d^{112}$ situadas nos ângulos entre os braços da cruz (Figura 2-16); neste estágio, o embrião alcança cerca de 97 blastômeros, 18 horas após a primeira clivagem.

A cruz é constituída por 20 células. A partir deste estágio, as células da cruz não se clivam durante 2 horas.

A seguir a célula mediana basal interna do braço ventral da cruz ($1b^{121}$) se divide, sendo seguida dos braços laterais $1a^{121}$ e $1c^{121}$ (Figura 2-19). A célula basal do braço dorsal $1d^{121}$ se cliva mais tarde, e a cruz alcança cerca de 24 células assim distribuídas:

Centro:

células da roseta apical $1a^{111}$ - $1d^{111}$
 células da roseta periférica $1a^{112}$ - $1d^{112}$

Braço dorsal:

célula basal $1d^{1211}$
 célula mediana interna $1d^{1212}$
 célula mediana externa $1d^{122}$
 célula terminal $2d^{11}$

Braço ventral:

célula basal $1b^{1211}$
 célula mediana interna $1b^{1212}$
 célula mediana externa $1b^{122}$
 célula terminal $2b^{11}$

Braço lateral direito:

célula basal $1a^{1211}$
 célula mediana interna $1a^{1212}$
 célula mediana externa $1a^{122}$
 célula terminal $2a^{11}$

Braço lateral esquerdo:

célula basal $1c^{1211}$
 célula mediana interna $1c^{1212}$
 célula mediana externa $1c^{122}$
 célula terminal $2c^{11}$

A descrição do desenvolvimento de cada braço a partir deste estágio será realizada separadamente, em razão de diferenças existentes entre cada braço.

O braço dorsal

Cerca de 21 horas e 30 minutos após a primeira clivagem, a célula $1d^{121}$ se cliva; a direção de clivagem desta célula forma um ângulo reto com a direção do braço dorsal (Figura 2-19). Assim, as células $1d^{1211}$ e $1d^{1212}$ vão se situar uma sobre a outra.

Em *L. stagnalis*, entretanto, a clivagem de $1d^{121}$ é paralela em relação à direção do braço dorsal, permanecendo as células $1d^{1211}$ e $1d^{1212}$ uma ao lado da outra (Verdonk, 1965).

A célula mediana externa $1d^{122}$ e a terminal $2d^{11}$ permanecem sem se dividir.

Os braços laterais

Cerca de 21 horas após a primeira clivagem, as células basais dos braços laterais da cruz $1a^{121}$ e $1c^{121}$ se clivam num plano em ângulo reto em relação ao braços laterais (Figura 2-19).

As células basais $1a^{1211}$ e $1c^{1211}$ estão em contato com as células apicais. As células medianas internas $1a^{1212}$ e $1c^{1212}$ se localizam entre as células basais e as células medianas externas $1a^{122}$ e $1c^{122}$ (Figura 2-19).

As células basais $1a^{1211}$ e $1c^{1211}$ serão as próximas a clivarem cerca de 24 horas após a primeira clivagem. Esta divisão ocorre num plano paralelo ao eixo longitudinal dos braços. Do mesmo modo que as células anteriores, as células medianas internas $1a^{1212}$ e $1c^{1212}$ se clivam aproximadamente 26 horas após a primeira clivagem (Figura 2-22).

Cerca de 30 horas após a primeira clivagem, as células $1a^{1212}$ e $1c^{1212}$ entram em divisão. As células $1a^{12121}$ e $1c^{12122}$ permanecem sem se dividir, até cerca de 36 horas após a primeira clivagem (Figura 2-23).

Cada braço possui sete células por cerca de 6 horas. As células mediana externa $1a^{122}$ e $1c^{122}$ e as células terminais $2a^{11}$ e $2c^{11}$ não se dividem mais.

A forma conspícua que caracteriza o estágio de cruz começa gradualmente a se modificar. Os braços laterais, que estavam situados em ângulo reto com o eixo dorso-ventral da cruz, vão se dirigindo para a região dorsal do embrião (Figura 2-22).

O braço ventral

A divisão da célula basal do braço ventral da cruz $1b^{121}$, ocorre cerca de 20 horas após a primeira clivagem, portanto antes das outras correspondentes $1a^{121}$,

$1c^{121}$ e $1d^{121}$. As células $1b^{1211}$ e $1b^{1212}$ vão se situar uma sobre a outra na direção longitudinal do braço ventral (Figura 2-19).

Cerca de 21 horas e 30 minutos após a primeira clivagem, a célula terminal do braço ventral $2b^{11}$ se cliva no sentido meridional (Figura 2-19).

Após a divisão destas células observa-se, pela primeira vez, a simetria bilateral no pólo animal do embrião. A próxima divisão no sentido meridional é da célula mediana interna $1b^{1212}$, dando origem a $1b^{12121}$ e $1b^{12122}$ (Figura 2-20).

Aproximadamente 21 horas após a primeira clivagem, as células $1b^{12121}$ e $1b^{12122}$ se clivam. Até o estágio anterior à divisão, estas duas células estavam em contato, através de uma pequena superfície no plano mediano. Entretanto, após esta clivagem, os respectivos descendentes se separam completamente (Figura 2-23). A célula $1b^{122}$ é a próxima a se dividir no plano meridional e é única célula mediana externa de cruz que continua se dividindo posteriormente (Figura 2-24).

As células $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ se encontram fortemente unidas logo após a divisão (Figura 2-24); aos poucos, porém, elas se afastam uma da outra, ficando unidas por uma pequena superfície (Figura 2-25).

As células terminais $2b^{111}$ e $2b^{112}$, que no início estão bem próximas, vão-se separando, alojando-se à direita e à esquerda da região situada acima da boca. Há, entretanto, casos, como ilustrado na Figura 2-27, em que a larva trocófora ainda apresenta as duas células terminais unidas.

As duas células $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ nunca se dividirão em *L. stagnalis*, enquanto que em *B. glabrata* continuam a divisão cerca de 43 horas após a primeira clivagem. Até este estágio elas podem facilmente ser distinguidas das outras que as limitam, porque estão ladeando a célula $1b^{1211}$, permanecendo maiores que as descendentes de $1b^{1212}$ (Figura 2-26).

O centro da cruz

Num período de cerca de 10 horas o centro da cruz permanece com as células da roseta apical $1a^{111}$ - $1d^{111}$ e as células da roseta periférica $1a^{112}$ - $1d^{112}$ em sua posição central, 27 horas após a primeira clivagem, porém, as células da roseta periférica $1a^{112}$ - $1d^{112}$ começam a se dividir (Figura 2-23).

As células da roseta periférica dorsal $1c^{112}$ e $1d^{112}$ estão situadas entre células basais $1a^{1211}$ e $1c^{1211}$ e a célula basal dorsal $1d^{1211}$ (Figura 2-19). As duas células filhas $1a^{1121}$ e $1b^{1121}$ continuam unidas, enquanto as células $1a^{1122}$ e $1b^{1122}$ se deslocam para a periferia (Figura 2-23). Na próxima etapa do desenvolvimento, observa-se o aumento gradativo da superfície das seis células centrais: as células da roseta

apical $1a^{111} - 1d^{111}$ e os descendentes das células da roseta periférica ventral $1a^{1121}$ e $1b^{1121}$ (Figura 2-24 e 25).

O desenvolvimento do segundo quarteto de micrômeros

O esquema da divisão deste quarteto se encontra ilustrado na Figura 4.

Quando o embrião atinge o estágio de 24 células (Figura 2-6) há um total de oito blastômeros ($2a^1 - 2d^1$ e $2a^2 - 2d^2$), pertencentes ao segundo quarteto de micrômeros. Cerca de 9 horas e 15 minutos após a primeira clivagem, as células $2a^1 - 2d^1$ se clivam (embrião com 29 blastômeros). Cerca de 10 horas após a primeira clivagem o quarteto $2a^2 - 2d^2$ se cliva (embrião com 33 blastômeros, Figura 2-9). No estágio de 51 blastômeros a clivagem de $2d^{21}$ é seguida pela $2a^{21}$, $2b^{21}$, $2c^{21}$ e $2a^{12} - 2d^{12}$, todas no sentido sinistrorso.

Terminadas as clivagens assinaladas no parágrafo anterior, o embrião alcança o estágio de 64 blastômeros (Figura 2-12 e 13), sendo 24 células originárias do segundo quarteto de micrômeros.

Os blastômeros $2a^{11} - 2d^{11}$ formam as células terminais dos braços da cruz. As células dos quadrantes $2a^{121} - 2d^{121}$ e $2a^{211} - 2d^{211}$ se localizam lado a lado e na parte inferior (mais próxima ao pólo vegetativo) às descritas anteriormente se encontram $2a^{122} - 2d^{122}$ e $2a^{212} - 2d^{212}$, formando a camada mediana. As células do quarteto inferior $2a^{22} - 2d^{22}$ se acham em conexão com os endômeros e mesômeros (Figura 2-10) no pólo vegetativo.

A próxima clivagem neste quarteto ocorre na camada mediana ($2a^{212} - 2d^{212}$ e $2a^{122} - 2d^{122}$), o blastômero $2d^{212}$ se cliva no sentido sinistrorso. Neste momento, o embrião atinge 80 blastômeros. Os blastômeros $2a^{122}$ e $2c^{122}$ são os que se clivam em seguida. O blastômero $2c^{212}$ se cliva no sentido sinistrorso e $2d^{211}$ e $2d^{2122}$ no sentido dextrorso.

As células $2a^{121}$, $2c^{121}$ e $2d^{121}$ se clivam no sentido dextrorso, enquanto $2a^{212}$ no sentido sinistrorso. As clivagens descendentes de quadrantes a, c e d se realizam regularmente, embora não sincronicamente (Figura 4).

A descrição das células descendentes do quadrante b será feita separadamente, em virtude das diferenças encontradas em relação aos outros já descritos.

O embrião no estágio de 64 blastômeros (Figura 2-12) apresenta as duas células $2b^{211}$ e $2b^{121}$ na posição superior, enquanto $2b^{212}$ e $2b^{122}$ se alojam na parte inferior, mais próxima ao pólo vegetativo.

Com o decorrer do desenvolvimento, observa-se a lenta descida da célula terminal ventral $2b^{11}$, deslocando-se a posição de $2b^{211}$ e $2b^{121}$ para os lados direito e esquerdo do embrião (Figura 2-19). Após a clivagem de $2b^{11}$, as duas células $2b^{111}$

e $2b^{112}$ se encontram rodeadas por quatro células na parte ventral, à direita por $2b^{211}$ e $2b^{212}$ e à esquerda por $2b^{122}$ e $2b^{121}$ (Figura 2-21).

Com o decorrer do desenvolvimento, cerca de 26 horas após a primeira clivagem, as duas células $2b^{212}$ e $2b^{122}$ se dividem, dando origem às células filhas $2b^{2121}$ e $2b^{2122}$ à direita e $2b^{1221}$ e $2b^{1222}$ à esquerda do embrião.

Durante as divisões seguintes, as células que descendem de $2b^{212}$ e $2b^{122}$, formam a região ventral da cabeça (Figura 2-26) e as mesmas irão se deslocando lateralmente para os blastômeros $2b^{211}$ e $2b^{121}$. A célula $2b^{211}$ se encontra limitada por $1a^{21}$ e $1a^{22}$ à direita e $2b^{121}$ por $1b^{21}$ e $1b^{22}$ à esquerda. Os blastômeros $2b^{211}$ e $2b^{121}$ foram observados com nitidez até cerca de 43 horas após a primeira clivagem, por apresentarem uma coloração diferente das células que os rodeiam. Presume-se que estas mesmas células não se dividem mais e irão se situar na região externa da fileira de células constituída pela descendência de $2b^{122}$ e $2b^{212}$.

Voltando à descrição geral deste segundo quarteto, observou-se que, desde o estágio de 33 blastômeros (10 horas após a primeira clivagem), o quarteto inferior $2a^{22}$ - $2d^{22}$ permanece sem clivar, retornando novamente á atividade quando o embrião atinge 92 blastômeros (18 horas após a primeira clivagem). O primeiro a se clivar é o $2b^{22}$, no sentido horizontal; e em seguida, o $2d^{22}$ se cliva no mesmo sentido (20 horas após a primeira clivagem); a célula filha $2d^{221}$ penetra entre os descendentes de $2d^{212}$ e $2d^{122}$ (Figura 2-18).

Enquanto M_1 e M_2 (mesoblasto primário) estiveram visíveis na região do pólo vegetativo, a célula $2d^{22}$ permaneceu sem se clivar (Figura 2-17). Após o desaparecimento destas células do mesoblasto primário da superfície do embrião, entretanto, ocorreu a clivagem do $2d^{22}$ (Figura 2-18). Cerca de 26 horas após a primeira clivagem, observou-se a divisão meridional da célula $2d^{221}$ na região próxima ao blastóporo.

A clivagem seguinte se verifica em $2a^{22}$ e $2c^{22}$ no sentido ligeiramente oblíquo (21 horas após a primeira clivagem), ficando estas células em limite com os endômeros (Figura 2-18).

As células $2a^{22}$, $2b^{22}$ e $2c^{22}$ foram consideradas por Holmes (1900) *apud* Raven (1958) como "estomoblastos", porque fazem parte da região periférica do blastóporo e mais tarde vão formar o estomódeo.

O desenvolvimento do terceiro quarteto de micrômeros

A seqüência de divisão deste quarteto é representada na Figura 5.

O terceiro quarteto de micrômeros (3a - 3d) se forma pela primeira vez no estágio de 24 blastômeros (Figura 2-6). A clivagem seguinte ocorre quando o

embrião atinge 45 células, dando origem a $3a^1 - 3d^1$ e $3a^2 - 3d^2$ (Figura 2-11). Estas oito células situam-se inter-radialmente, entre o segundo quarteto de micrômeros descendentes de $2a^1 - 2d^1$ e $2a^2 - 2d^2$ (Figura 2-10). O quarteto superior $3a^1 - 3d^1$ está em conexão com o trocoblasto $1a^2 - 1d^2$, enquanto que $3a^2 - 3d^2$ se acha em contato com os macrômeros no pólo vegetativo.

A partir deste estágio, ocorre uma sincronia no desenvolvimento deste quarteto. Os blastômeros $3a^1$ e $3b^1$, situados na parte ventral do embrião, permanecem sem se clivar até cerca de 16 horas após a primeira clivagem (Figura 2-13), enquanto $3a^2$ e $3b^2$ se clivam cerca de 2 horas antes. Na região dorsal, porém, ocorre o oposto: as células $3c^1$ e $3d^1$ (Figura 2-12) se clivam cerca de quatro horas antes de $3c^2$ e $3d^2$ que só se clivam cerca de 18 horas após a primeira clivagem (Figura 2-17).

O primeiro blastômero do quarteto superior a se clivar é $3d^1$, que o faz em divisão bilateral, no estágio de 51 blastômeros. Em seguida, $3a^2$, $3b^2$ e $3c^1$ se clivam também no mesmo sentido, atingindo o embrião no estágio de 55 blastômeros.

Um aspecto inconfundível no pólo vegetativo é delineado neste estágio, cerca de 15 horas após a primeira clivagem (Figura 2-13), em razão da diferença na direção de clivagem entre as células que se localizam na parte ventral ($3a^{21}$, $3a^{22}$, $3b^{21}$ e $3b^{22}$) e a parte dorsal ($3c^2$ e $3d^2$) deste quarteto. As clivagens que se seguem são nas células $3a^1$ e $3b^1$ no sentido bilateral.

Os blastômeros $3d^{11}$ e $3d^{12}$ se clivam horizontalmente dando origem a células filhas cuja metade superior $3d^{111}$ e $3d^{121}$ apresentam a superfície maior que a inferior, $3d^{112}$ e $3d^{122}$.

A clivagem continua nos blastômeros $3a^{21}$ e $3b^{21}$ no sentido horizontal com ligeiro desvio para a direita, enquanto que em $3a^{22}$ e $3b^{22}$ é no sentido sinistrorso. Os blastômeros $3c^{11}$ e $3c^{12}$ se clivam do mesmo modo que $3d^{11}$ e $3d^{12}$. O embrião neste período atinge o estágio de 76 células, das quais 22 pertencem ao terceiro quarteto de micrômeros.

Os blastômeros $3c^2$ e $3d^2$ se clivam bilateralmente, no estágio de 97 células (18 horas após a primeira clivagem). As células da geração $3a$ e $3b$ ($3a^{211}$, $3a^{221}$, $3b^{211}$ e $3b^{221}$) se clivam bilateralmente (Figura 2-18).

A próxima clivagem acontece nas células $3c^{111}$, $3c^{121}$, $3d^{111}$ e $3d^{121}$, no sentido horizontal. Neste estágio, o embrião atinge 106 células, das quais 31 pertencem ao terceiro quarteto de micrômeros.

Em seguida, as células $3b^{11}$ e $3b^{12}$ se clivam no sentido horizontal, seguida pelas células $3a^{11}$ e $3a^{12}$ no mesmo sentido, alcançando o embrião um número total de 125 blastômeros.

Na região ventral do embrião, há um grupo de células pequenas originadas pela divisão de $3a^2$ e $3b^2$ (Figura 2-18). Estas células provavelmente irão formar o mesoblasto secundário.

O estudo da divisão deste quarteto foi observado até o estágio de 130 células, das quais 36 pertencentes ao terceiro quarteto de micrômeros.

Endômeros

O quarto quarteto de micrômeros

A seqüência da divisão do quarto quarteto de micrômeros é apresentada na Figura 5.

No período em que o embrião atinge o estágio de 40 blastômeros, observa-se pela primeira vez a formação dos endômeros 4a, 4b e 4c, separando-se dos macrômeros 4A, 4B e 4C (11 horas após a primeira clivagem). Na Figura 2-10, um embrião no estágio 45 células se apresenta com os endômeros 4a, 4b e 4c.

Os endômeros 4a - 4c se clivam no sentido bilateral, quando o embrião atinge 64 células (Figura 2-13). A partir desta clivagem, as células se organizam em forma de ferradura (4a1, 4a2, 4b1, 4b2, 4c1 e 4c2), circundando os macrômeros. O primeiro endômero a se clivar é o $4a^1$ (16 horas após a primeira clivagem) no sentido sinistrorso: o embrião atinge o total de 76 células. O próximo a se clivar é $4c^2$ (17 horas após a primeira clivagem) no sentido dextrorso: o embrião atinge o total de 80 células. Em seguida se cliva $4b^1$ (17 horas após a primeira clivagem), no sentido sinistrorso, alcançando o embrião o total de 83 blastômeros.

A clivagem seguinte ocorre em $4a^2$ e $4b^2$, no sentido sinistrorso, enquanto $4c^1$ o faz no sentido dextrorso; o embrião atinge assim 92 células, das quais 12 endômeros pertencentes à geração 4a - 4c. A próxima clivagem nesta região ocorre na fase de 130 blastômeros. Os endômeros $4b^{11}$, $4b^{21}$ e $4b^{22}$ se cliva bilateralmente.

O quinto quarteto de micrômeros

Os macrômeros, depois da origem dos endômeros, permanecem sem se clivar até o embrião atingir 92 células. A partir deste momento, o macrômero 4A se cliva (18 horas após a primeira clivagem), sendo seguido por 4B. O macrômero 4C se cliva (20 horas após a primeira clivagem), e o embrião atinge 111 células.

Até o estágio de 130 blastômeros, foi observada apenas a formação da 5a, 5b e 5c que se destacam entre os macrômeros e os descendentes do quarto quarteto (Figura 2-18).

Em *B. glabrata* foi observada a divisão de 4D antes da gastrulação.

O mesoblasto primário

O período de repouso é uma característica no desenvolvimento embrionário dos moluscos, quando atingem o estágio de 24 blastômeros. Este período se prolonga por cerca de 3 horas, quando o embrião entra novamente em atividade de clivagem com o macrômero 3D. Esta célula dá origem ao mesoblasto primário M(4d), (Figura 2-8). Em *B. glabrata* esta clivagem é no sentido dextrorso.

A primeira clivagem do mesoblasto primário ocorre quando o embrião atinge 45 células, no sentido ligeiramente oblíquo. No início da clivagem, as células M_1 e M_2 mostram a superfície relativamente grande (Figura 2-10). Entretanto, durante o desenvolvimento a superfície destas células vai diminuindo (Figura 2-17).

Em *B. glabrata*, M_1 e M_2 permanecem na superfície até o estágio, de 106 blastômeros (Figura 2-17). Neste estágio porém, é visível somente pequena superfície triangular das células que se destacam entre o macrômero 4D e a célula $2d^{22}$. Em todas as preparações, observou-se que a ausência de M_1 e M_2 da superfície do embrião coincidia com a clivagem de $2d^{22}$ ($2d^{221}$ e $2d^{222}$) (Figura 2-18).

Em *B. glabrata* e *L. stagnalis*, a linhagem celular de todos os quartetos de micrômeros foi estudada até o estágio de 130 blastômeros respectivamente. A partir deste estágio estudou-se especificamente a região cefálica do molusco.

Gastrulação

A gastrulação é uma etapa do desenvolvimento embrionário que inclui o final da clivagem das células; há, portanto, o início do crescimento, da diferenciação e da movimentação celular.

A gastrulação ocorre, tanto em *B. glabrata* quanto em *L. stagnalis*, por invaginação ou endobolia, 26 horas após a primeira clivagem. Inicialmente, o embrião sofre um achatamento na região do pólo animal em direção ao pólo vegetativo.

A princípio, verifica-se a penetração dos macrômeros 5A - 5C, seguida pelos endômeros 5a - 5c e os descendentes de 4a - 4c. À medida que as células vão-se movimentando para o interior, a concavidade irá aumentando, formando inicialmente uma abertura esférica que vai-se fechando gradualmente. A abertura, que é o blastóporo, com o desenvolvimento vai sendo reduzida, pela aproximação lateral dos lábios, transformando-se mais tarde numa fenda. Esta abertura se comunica com o exterior até cerca de 39 horas após a primeira clivagem. Então, fecha-se completamente, permanecendo só a imagem virtual da abertura. Mais tarde, no final da gastrulação haverá o aparecimento da boca nesta região.

No estágio inicial da gastrulação, o blastóporo se encontra situado ao lado oposto da figura em cruz, no pólo vegetativo original. Com o decorrer do desenvolvimento, ele será deslocado para a região ventral do embrião, sob as células $2b^{2211}$ e $2b^{2212}$. Na Figura 2-22, um embrião no estágio de gástrula é apresentado. A característica da fase inicial da gastrulação é a deformação da figura em cruz, em razão do alargamento do braço ventral da cruz.

Trocófora

Nesta fase larvária a *B. glabrata* apresenta-se com uma dupla fileira celular situada na região acima da boca, o prototroco (Figura 2-27 e 28). Observa-se uma série de cílios que recobrem a superfície destas células e que auxiliam na movimentação da larva. O prototroco separa o corpo em duas partes, a região pré-trocal e a pós-trocal. Assim, ele circunda a parte ventral e lateral da região pré-trocal. A região dorsal, porém, é formada por um grupo de células, a vesícula cerebral, que se apresenta sem cílios.

A Figura 3 ilustra a linhagem celular da região cefálica do molusco.

A região pré-trocal é constituída por um conjunto de células, na parte mediana central, a placa apical. Lateralmente a esta placa apical, se encontram as placas cefálicas (conjunto de células pequenas). A parte dorsal destas formações é margeada por células maiores que constituem a vesícula cerebral. Esta vesícula cerebral se encontra em contato com ambos os braços laterais da fileira superior do prototroco. A boca está situada na parte ventral do prototroco. Distingue-se, também, na região logo abaixo da boca, "a banda ciliar pós-trocal", que separa duas regiões de células pequenas que formarão o pé. Na região dorsal oposta à boca, encontra-se a glândula da concha, com uma delgada concha já formada, localizando-se numa posição simétrica à boca. Este estágio larvário em *Biomphalaria* transcorre, ainda, dentro da cápsula do ovo, como no caso de outros pulmonados. As diferentes partes que constituem a região cefálica da larva, serão descritas em seguida.

Prototroco (Pr.)

Em *B. glabrata* o prototroco é constituído por uma dupla fileira de células, uma superior formada pelas células terminais do braço ventral da cruz $2b^{111}$ e $2b^{112}$, situadas no centro e na parte ventral do prototroco e que estão ligadas à direita com $1a^{21}$, $1a^{22}$ e à esquerda com as células $1b^{21}$ e $1b^{22}$ (Figura 2-27). A segunda fileira, inferior, que está situada logo acima da boca, constituída pelos descendentes das células $2b^{122}$ e $2b^{122}$ e pelas células $2b^{211}$ e $2b^{121}$.

Logo após a clivagem da célula terminal do braço ventral $2b^{11}$, cerca de 23 horas após a primeira clivagem, $2b^{11}$ e $2b^{12}$ se localizarão entre as duas células $2b^{121}$ e $2b^{211}$ (Figuras 2-21 e 22). Com o decorrer do desenvolvimento, há um alargamento na superfície das células $2b^{212}$ e $2b^{122}$. Aproximadamente 28 horas após a primeira clivagem, $2b^{212}$ e $2b^{122}$ entram em segmentação, deslocando as células $2b^{121}$ e $2b^{211}$ para um nível mais inferior em relação a $2b^{11}$ e $2b^{12}$.

Cerca de 30 horas após a primeira clivagem, observa-se uma reduzida área de ligação entre as células de $2b^{11}$ e $2b^{211}$ à direita e $2b^{12}$ e $2b^{121}$ esquerda da larva. A conexão vai desaparecendo entre as duas células, em ambos os lados, à medida que a larva atinge cerca de 34 horas, após a primeira clivagem (Figura 2-24).

As células terminais da cruz $2b^{11}$ e $2b^{12}$, que inicialmente também se encontravam ligadas entre si com grande superfície de contato (Figuras 2-21 e 22) vão aos poucos sendo afastadas pela descida do blastômero $1b^{1211}$ (Figuras 2-25 e 26). A descida desta célula tem início após a segmentação de $1b^{122}$, em $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$. Os blastômeros $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ permanecem interligados ventralmente acima das células $2b^{11}$ e $2b^{12}$, até aproximadamente 40 horas após a 1ª clivagem do ovo.

O afastamento das células $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ é sempre completo, porém as células terminais do braço ventral $2b^{11}$ e $2b^{12}$ ou podem permanecer ligadas até um estágio bem mais avançado (Figura 2-27) ou serem completamente afastadas pela célula apical $1b^{1211}$ (Figura 2-28). Quando unidas formam a fileira superior do prototroco, que é a seguinte: $1a^{21}$, $1a^{22}$, $2b^{11}$, $2b^{12}$, $1b^{21}$ e $1b^{22}$.

A camada inferior do prototroco, contudo, é constituída pelos descendentes de $2b^{212}$ e $2b^{122}$ e pelas células $2b^{211}$ e $2b^{121}$ (estas últimas permanecem durante vários estádios posteriores, sem indicação de clivagem formada de nove células de cada lado).

Em comparação com a larva de *L. stagnalis* que só possui oito células ($1b^{1221}$, $1b^{1222}$, $2b^{11}$, $2b^{12}$, $1a^{21}$, $1a^{22}$, $1b^{21}$ e $1b^{22}$) esta estrutura em *B. glabrata* é bem mais desenvolvida.

EM *B. glabrata*, PRIMEIRA FILEIRA:

Células terminais do braço ventral da cruz:

$2b^{11}$ e $2b^{12}$

Células do trocoblasto anterior:

$1a^{21}$ e $1a^{22}$

$1b^{21}$ e $1b^{22}$

SEGUNDA FILEIRA:**Células do segundo quarteto de micrômeros:** $2b^{121}$ e $2b^{211}$ **Descendentes das células:** $2b^{122}$ e $2b^{212}$

Em alguns casos, as células que compõem a segunda fileira do prototroco estão em contato com a região das placas cefálicas, separando, portanto, o $2b^{111}$ ou $2b^{112}$ de sua conexão com o $1a^{21}$ ou $1b^{21}$. Isto foi possível distinguir em razão da coloração transparente das células que constituem a primeira fileira, em contraste com cor escura dos componentes da segunda fileira do prototroco.

Placa apical (P.A)

A placa apical é composta por sete células, com revestimento ciliar, e são relativamente volumosas, situadas entre as placas cefálicas no meio da região da cabeça (Figura 2-28).

As quatro células dorsais são as células da roseta apical $1a^{111}$ - $1d^{111}$, as quais permanecem sem se dividir desde a formação das células da roseta periférica. As duas células $1a^{121}$ e $1b^{121}$ estão na parte ventral destas quatro células e são originadas pela clivagem das células da roseta periférica. A célula basal do braço ventral $1b^{1211}$ é o último componente da placa apical. Situa-se quase sempre na parte superior dos descendentes de $2b^{212}$ e $2b^{122}$, isto é, acima da boca da larva. Contudo, há casos em que $2b^{111}$ e $2b^{112}$ podem estar na parte inferior do $1b^{1211}$ e acima dos descendentes de $2b^{212}$ e $2b^{122}$. A disposição destas células pode sofrer variação em diferentes larvas mas, em geral, a posição das células da roseta apical é constante: $1a^{111}$ se encontra em conexão com $1c^{111}$, enquanto que $1b^{111}$ e $1d^{111}$ são separados.

Células que constituem a placa apical:

As células da roseta apical:

 $1a^{111}$ - $1d^{111}$

Células da roseta periférica:

 $1a^{121}$ - $1b^{121}$

Célula basal do braço ventral da cruz:

 $1b^{1211}$

Placas cefálicas (P.C.)

O rudimento destas placas se origina interinamente da primeira geração de ectômeros (Figura 2-28). Acompanhando-se o seu desenvolvimento desde o estágio inicial da cruz, observa-se que a parte dorsal destas placas é constituída pelas gerações das células da roseta periférica $1d^{112}$ à direita e $1c^{112}$ à esquerda da larva, (estas células são visíveis nos embriões vistos nas Figuras 2-19 e 20). Mais para o centro, à direita, é formada pelos descendentes da célula basal $1a^{1211}$ e da geração da célula mediana interna, $1a^{1212}$. No lado esquerdo tem-se o equivalente: a geração de $1c^{1211}$ e $1c^{1212}$. Na parte ventral, nota-se o desligamento das células $1a^{1122}$ e $1b^{1122}$ que irão se localizar respectivamente à direita e à esquerda da larva, para formação das placas cefálicas (Figura 2-23).

Seguindo-se o desenvolvimento da célula mediana interna do braço ventral da cruz $1b^{1212}$, verifica-se que, logo após a sua primeira clivagem, as células filhas $1b^{12121}$ e $1b^{12122}$ se limitam por grande superfície de contato (Figuras 2-20 e 21). Com o decorrer do tempo, porém, elas são gradativamente separadas, pela descida da célula básica ventral $1b^{1211}$ (Figura 2-22). Portanto, antes da próxima clivagem elas se encontram completamente separadas indo localizar-se lateralmente (Figura 2-23). Finalmente, do braço ventral da cruz, a célula mediana externa $1b^{122}$ é a primeira a se segmentar. Seguindo-se a esta divisão $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ permanecem em contato íntimo (Figura 2-24); aos poucos, as mesmas começam a se separar pela descida da célula $1b^{1211}$ (Figura 2-25) até serem completamente desligadas uma da outra, aproximadamente 40 horas após a primeira clivagem (Figura 2-26). Cerca de 42 horas após a primeira clivagem, as células $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ se segmentam pela primeira vez e são pressionadas para a direção lateral da larva, fazendo parte portanto das placas cefálicas.

Em *L. stagnalis* (Verdonk, 1965) estas duas células $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ pertencem ao prototroco. Em *B. glabrata* a linhagem celular destas células foi cuidadosamente observada.

Cada placa cefálica se compõe de:

	lado direito	lado esquerdo
parte dorsal	$1d^{1121}$ $11d^{1122}$	$1c^{1121}$ $1c^{1122}$
parte central	$1a^{12111}$ $1a^{12112}$ $1a^{12121}$	$1c^{12111}$ $1c^{12112}$ $1c^{12121}$

	1a ¹²¹²²	1c ¹²¹²²
parte	1a ¹¹²²	1b ¹¹²²
ventral	1b ¹²¹²¹	1b ¹²¹²²
	1b ¹²²¹	1b ¹²²²

Observando-se o tamanho, o número e a posição das células que compõem as placas cefálicas, elas parecem ser completamente simétricas, embora tenham sido derivadas diferentemente. Assim, a placa cefálica ao lado direito se origina dos três quadrantes (a, b e d) enquanto que a do lado esquerdo somente de dois (b e c). Isto devido a posição do quadrante que está situado à direita do eixo mediano da larva.

Vesícula cerebral (V.C.)

Abrangendo a parte dorsal da placa apical e das placas cefálicas, encontram-se 12 células maiores, componentes da vesícula cerebral (Figura 2-28). O embrião no estágio de 83 células (18 horas após a primeira clivagem) já possui todos os constituintes da vesícula cerebral (Figura 2-14), exceto o blastômero 1d¹²¹ que se cliva posteriormente (aproximadamente 21 horas e 30 min. Após a primeira clivagem), originando as células filhas 1d¹²¹¹ e 1d1²¹².

Todas as células que constituem o braço dorsal da cruz vão contribuir para formação da vesícula cerebral.

As células 1d¹²¹² (célula mediana interna) e 1d¹²² (célula mediana externa) são comprimidas pelas células do trocoblasto posterior, de um lado pelo 1c²¹ e 1c²² e do outro pelo 1d²¹ e 1d²². Esta situação se prolonga durante cerca de 15 horas (no intervalo a partir de 28 até 43 horas após a primeira clivagem). Depois deste período, as células se alargam e se comprimem uma sobre a outra.

Para o lado esquerdo do braço posterior da cruz, as células do trocoblasto posterior 1c²¹ e 1c²², a célula mediana externa 1c¹²² e a célula terminal do braço lateral 2c¹¹, irão formar a vesícula cerebral. Do lado direito da larva, as células do trocoblasto posterior, 1d²¹ e 1d²², a célula mediana externa 1a¹²² e a célula terminal do braço lateral 2a¹¹ completarão o conjunto que formará a vesícula cerebral.

Em geral, as quatro células 1a¹²², 1d²², 1c²² e 1c¹²² são fortemente coradas com o nitrato de prata, destacando-se das demais.

Em algumas larvas foi observada divisão da célula 1d¹²², que normalmente não se segmenta, elevando a 13 o número total de células.

Formação da vesícula cerebral:

Células do braço dorsal da cruz:

1d¹²¹¹ e 1d¹²¹²
1d¹²² e 2d¹¹

Trocoblasto posterior:

1c²¹ e 1c²²
1d²¹ e 1d²²

Células dos braços laterais da cruz:

1a¹²² e 2a¹¹
1c¹²² e 2c¹¹

Veliger

Em *B. glabrata* esta fase do desenvolvimento larvário ocorre dentro da cápsula do ovo.

O estágio de "veliger jovem" ocorre de 96 horas após a primeira clivagem (Figura 2-29). O prototroco se transforma no órgão mais evoluído, o velum, havendo também desenvolvimento maior da concha e do pé. A concha no estágio de trocófora situa-se simetricamente em relação à boca.

No veliger, porém, verifica-se o início da assimetria pelo desvio da concha, que sofre torção para o lado direito. Neste estágio, as células que compõem o velum se encontram comprimidas entre as células das placas cefálicas e as células que se encontram acima da região da boca. Em geral, na parte ventral há uma fileira de células (geração de 2b²¹² e 2b¹²²). As duas células terminais do braço ventral da cruz se separam, alojando-se lateralmente. Os blastômeros que formam a placa apical e a vesícula cerebral permanecem sem se alterar, desde o estágio de trocófora. Os das placas cefálicas, porém, continuam a se dividir, mostrando a presença de várias células pequenas na futura região, onde se formarão os tentáculos e os olhos. Na parte ventral do velum, observa-se uma parte característica que compreende a região do pé.

No veliger mais evoluído, ou "hippo stage" (Raven, 1949), o aparecimento dos olhos, que, a princípio, se evidenciam como um halo pigmentado na região das placas cefálicas (região tentacular, Figura 2-30). Em *L. stagnalis* também o gânglio cerebral tem origem na região tentacular. A região pré-trocal se apresenta mais desenvolvida com o esboço dos tentáculos que se formam na região tentacular. Na região pós-trocal, contudo, o pé se encontra bem mais diferenciado, aumentando de

tamanho. O velum vai sendo comprimido cada vez mais, principalmente na sua parte lateral.

Nesta fase, se observa o início do enrolamento da concha e mais tarde o seu crescimento. Neste estágio há a formação quase completa de um caramujo jovem.

O estágio de veliger mais evoluído ou "hippo stage" foi o período final no estudo do desenvolvimento normal. Ainda neste período, certas estruturas larvárias se encontram distintas. A 25° C o caramujo pode eclodir, a partir do sexto dia após primeira clivagem.

Principais diferenças entre as linhagens celulares das espécies *Limnaea stagnalis* e *Biomphalaria glabrata*

1. Em *L. stagnalis* a clivagem é dextrorsa ou padrão e em *B. glabrata* é sinistrorsa ou reversa.
2. Em *L. stagnalis*, Verdonk (1965) observou que a divisão da célula basal do braço dorsal da cruz $1d^{121}$ se faz no sentido paralelo à direção do braço dorsal da cruz; os blastômeros ($1d^{1211}$ e $1d^{1212}$) se alojam um ao lado do outro. Em *B. glabrata*, entretanto, esta mesma célula $1d^{121}$ se divide num plano em ângulo reto em relação ao braço dorsal (Camey & Verdonk, 1970) e os blastômeros se alojam um acima do outro.
3. Em *L. stagnalis* as células medianas externas do braço ventral da cruz, $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$, irão fazer parte do prototroco, permanecendo sem se dividir. Em *B. glabrata*, estas células $1b^{1221}$ e $1b^{1222}$ irão tomar parte na formação das placas cefálicas e, portanto, se dividem diversas vezes.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece:

Ao Prof. Dr. N.H. Verdonk que foi orientador do trabalho de *Embriologia de B. glabrata*, realizado na Holanda. A Dra. Maria Nazareth Rabello-Gay, pela leitura, críticas e sugestões do texto.

A parte de datilografia a Cristina Antonia Albuquerque das Chagas.

FIGURAS

FIGURA 1-1A: Ovo indiviso de *B. glabrata*, com os dois corpúsculos polares

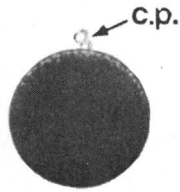


FIGURA 1-1B: Início do sulco de clivagem no pólo animal (hora 0)

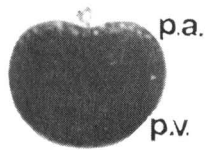


FIGURA 1-2: Sulco de clivagem, 3 minutos após o estágio 1B ou primeira clivagem

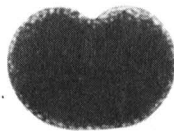
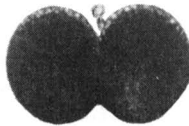


FIGURA 1-3: Sulco de clivagem, 4 minutos



EMBRIOLOGIA

FIGURA 1-4: Os dois blastômeros ligados somente por uma pequena superfície citoplasmática, 10 minutos

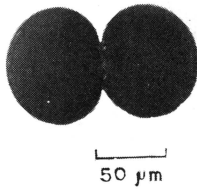


FIGURA 1-5: Os dois blastômeros com maior superfície de contato, 21 minutos

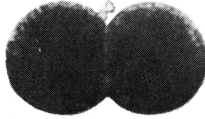


FIGURA 1-6/7: Os dois blastômeros continuando com a superfície de contato, 26 e 38 minutos respectivamente



FIGURA 1-8: Início da cavidade de clivagem, 45 minutos



FIGURA 1-9: Cavidade de clivagem mais nítida, 75 minutos

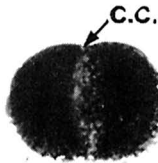


FIGURA 1-10: Segunda clivagem, 80 minutos após a primeira clivagem



EMBRIOLOGIA

FIGURA 1-11: Os quatro blastômeros nítidos, 91 minutos

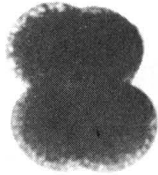


FIGURA 1-12/13: Início da cavidade de clivagem entre os dois blastômeros, 98 a 103 minutos respectivamente



FIGURA 1-14/15: Superfície quase arredondada dos blastômeros, 123 e 134 minutos respectivamente



TÓPICOS EM MALACOLOGIA MÉDICA

FIGURA 1-16: Início da terceira clivagem – formação do primeiro quarteto de micrômeros, 160 minutos após a primeira clivagem



FIGURA 1-17: Terceira clivagem, 165 minutos

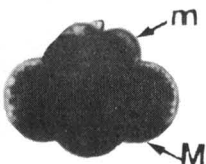
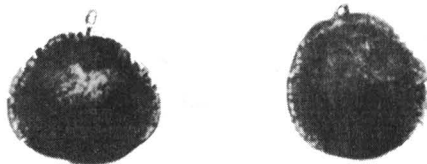


FIGURA 1-18/19: os blastômeros unidos, 173 e 181 minutos respectivamente



EMBRIOLOGIA

FIGURA 1-20: Quarta clivagem, 230 minutos após a 1ª clivagem

c.p. = corpúsculo polar
p.a. = pólo animal
p.v. = pólo vegetativo
c.c. = cavidade de clivagem
m. = micrômero
M. = macrômero

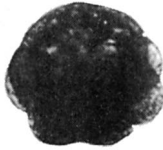


FIGURA 2-1: Primeira clivagem, estágio de dois blastômeros

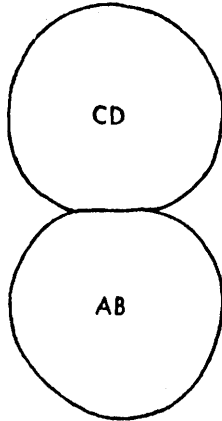
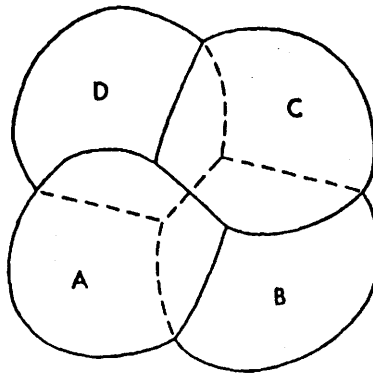


FIGURA 2-2: Segunda clivagem, estágio de quatro blastômeros, 80 minutos após a primeira clivagem



TÓPICOS EM MALACOLOGIA MÉDICA

FIGURA 2-3: Terceira clivagem, estágio de oito blastômeros, primeiro quarteto de micrômeros (1a-1d) 160 minutos após a primeira clivagem

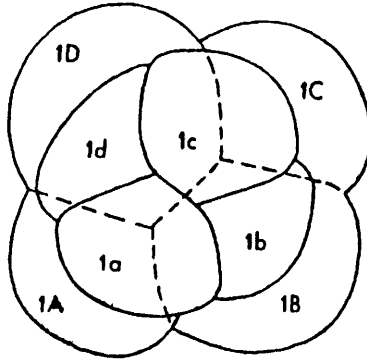


FIGURA 2-4: Quarta clivagem, estágio de 12 blastômeros, o segundo quarteto (2a - 2d) está situado na posição dextróptica com relação aos macrômeros (2A - 2D)

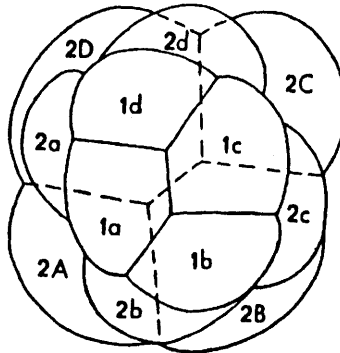
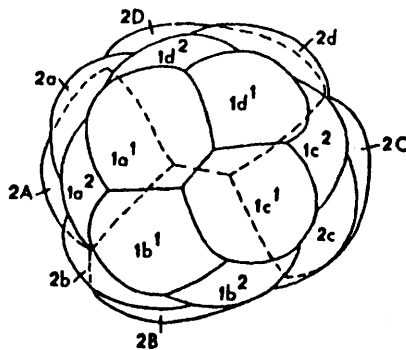


FIGURA 2-5: Quinta clivagem, estágio de 16 blastômeros, o trocoblástico primário $1a^2-1d^2$ é formado, 5 horas após a primeira clivagem



EMBRIOLOGIA

FIGURA 2-6: Estádio de 24 blastômeros, 6 horas após a primeira clivagem

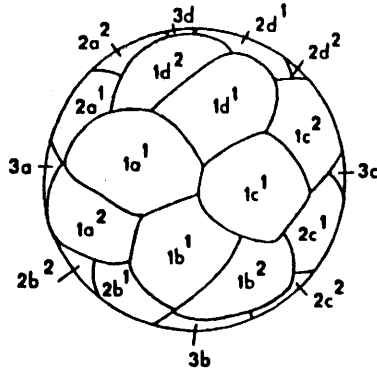


FIGURA 2-7: Estádio de 24 blastômeros, vista pelo pólo vegetativo. O macrômero 3D é caracterizado pela forma arredondada, 7 horas após a primeira clivagem

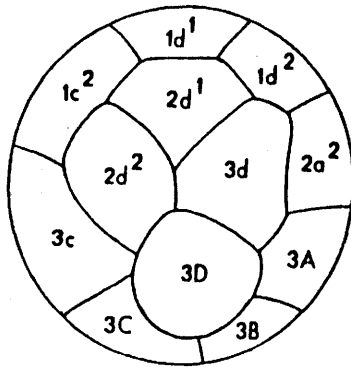


FIGURA 2-8: Estádio de 25 blastômeros (pólo vegetativo). O mesoblasto primário 4d ou M se forma, 9 horas após a primeira clivagem do ovo

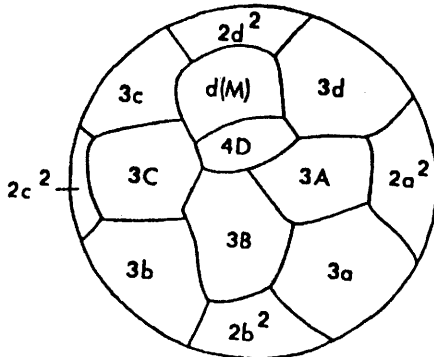


FIGURA 2-9/10: Estádio de 33 blastômeros (pólo animal), 10 horas após a primeira clivagem. Estádio de 45 blastômeros (pólo vegetativo). O mesoblasto primário sofreu a clivagem ($M_1 - M_2$), 12 horas após a primeira clivagem

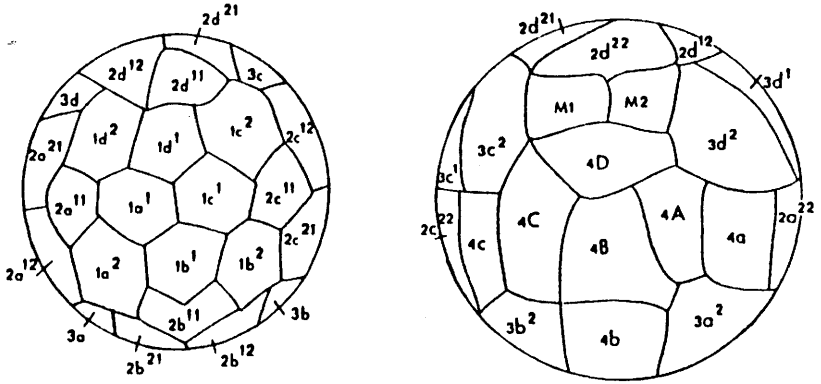


FIGURA 2-11: Estádio de 45 blastômeros (pólo animal), primeira indicação da figura em Cruz

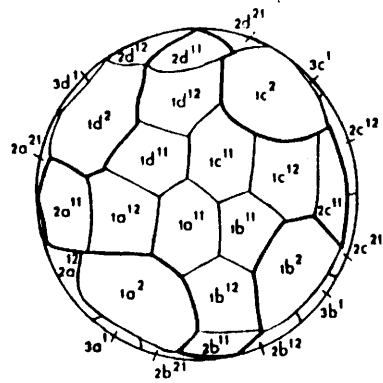
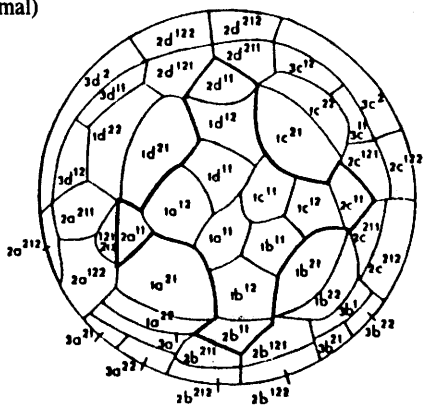


FIGURA 2-12: Figura em Cruz no estágio de 64 blastômeros, 15 horas após a primeira clivagem, (pólo animal)



EMBRIOLOGIA

FIGURA 2-13: Estádio de 64 blastômeros (pólo vegetativo)

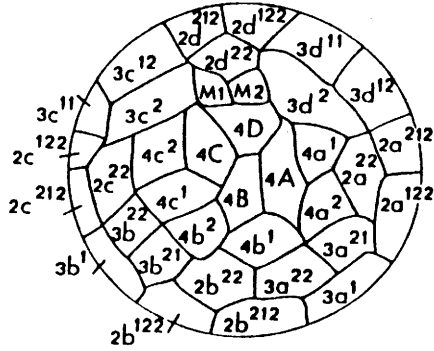


FIGURA 2-14: Estádio de 83 blastômeros (pólo animal), 17 horas após a primeira clivagem

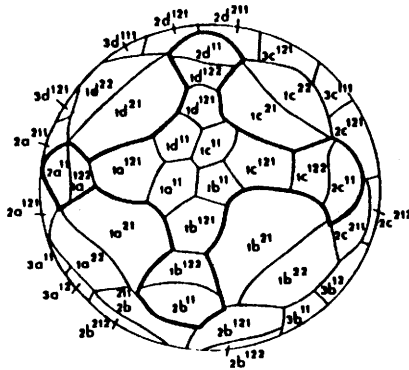


FIGURA 2-15: Mesmo estágio de 14, vista lateral. Células do segundo quarteto estão inseridas entre as do terceiro quarteto

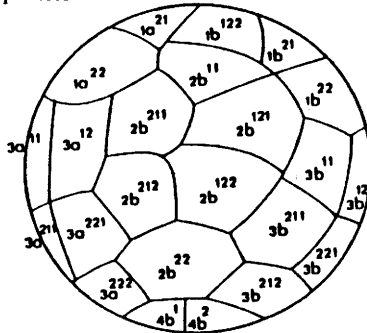


FIGURA 2-16: Estádio de 97 células, 18 horas após a primeira clivagem

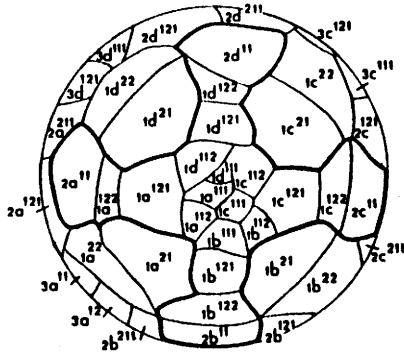


FIGURA 2-17: Estádio de 106 blastômeros (pólo vegetativo), 19 horas após a primeira clivagem. O mesoblasto primário M_1 e M_2 com pequena superfície externa

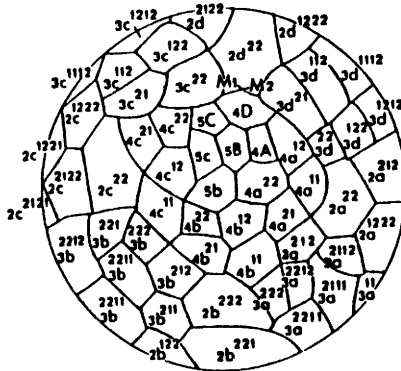
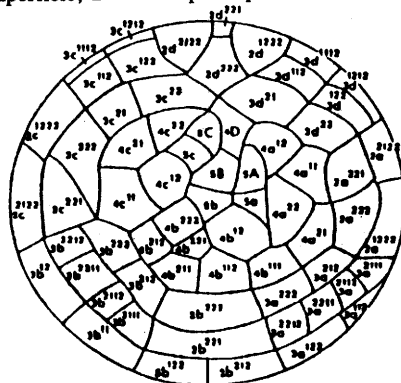


FIGURA 2-18: Estádio de 125 blastômeros (pólo vegetativo). O mesoblasto primário M_1 e M_2 já não visível na superfície, 21 horas após a primeira clivagem



EMBRIOLOGIA

FIGURA 2-19: Estádio de 130 blastômeros (pólo animal), 21:30 horas após a primeira clivagem

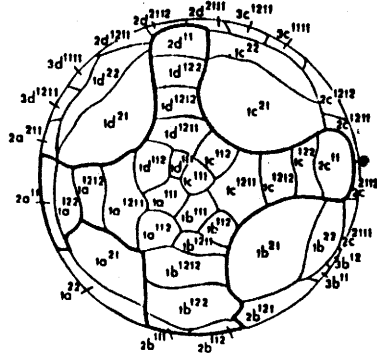


FIGURA 2-20: Divisão de 1b¹²¹², 22 horas após a primeira clivagem

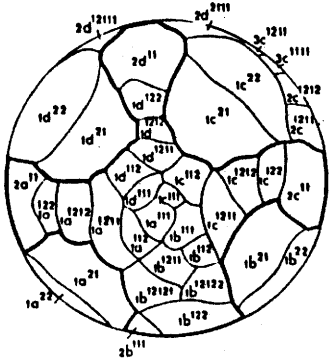


FIGURA 2-21: As quatro células do segundo quarteto 2b²¹¹, 2b²¹², 2b¹²² e 2b¹²¹, que formará o prototroco, 24 horas após a primeira clivagem

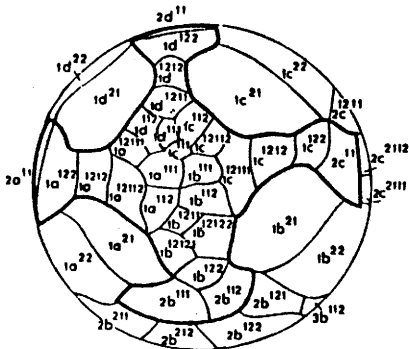


FIGURA 2-22: Estádio de 26 horas após a primeira clivagem, gástrula

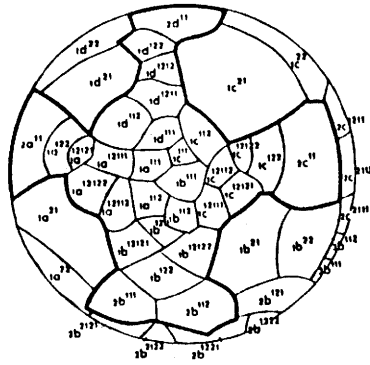


FIGURA 2-23: Estádio de 30 horas após a primeira clivagem, gástrula

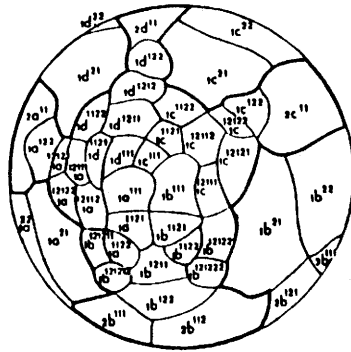


FIGURA 2-24: Estádio de 34 horas após a primeira clivagem, gástrula

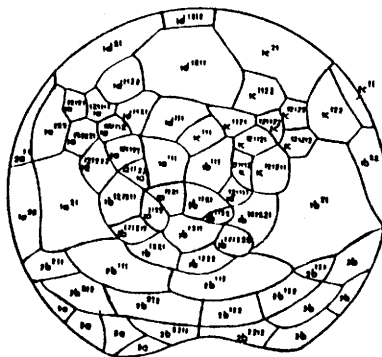


FIGURA 2-25: Estádio 36 horas após a primeira clivagem, gástrula

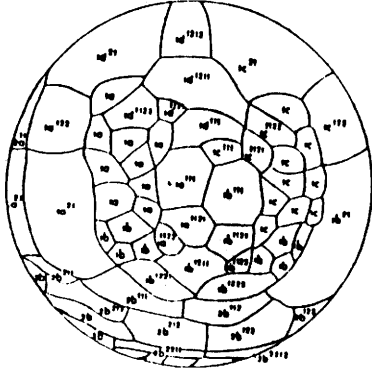


FIGURA 2-26: Estádio de trocófora jovem, 43 horas após a primeira clivagem

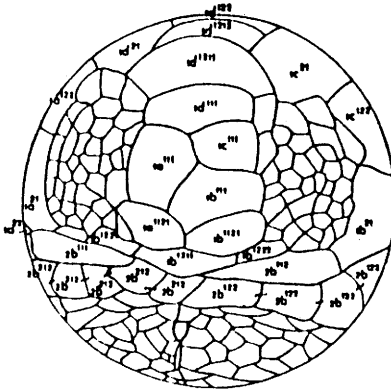


FIGURA 2-27: Estádio de trocófora, 66 horas após a primeira clivagem

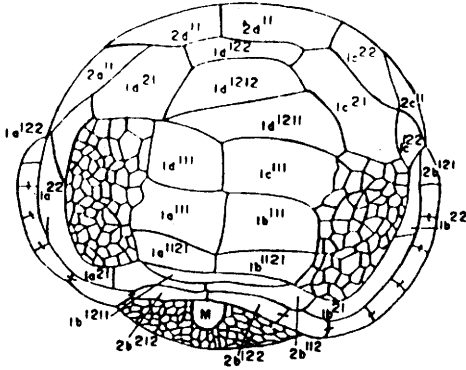


FIGURA 2-28: Estádio de trocófora, 74 horas após a primeira clivagem

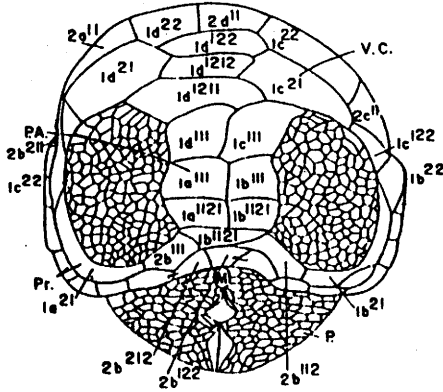


FIGURA 2-29: Veliger jovem. Delimitação do pé, 96 horas após a primeira clivagem

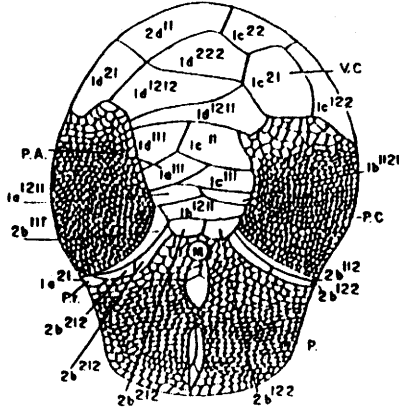


FIGURA 2-30: Veliger, com estruturas larvárias como a placa apical, **vesícula cerebral** e **velum** presentes. Duas regiões tentaculares com os olhos e **tentáculos**, 120 horas após a primeira clivagem

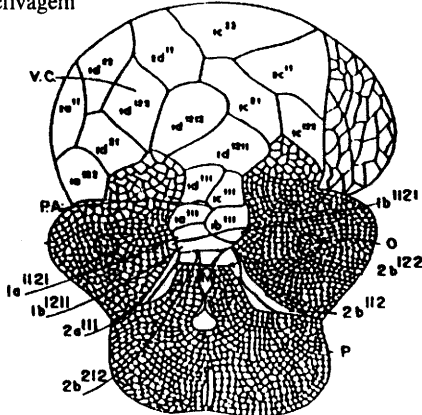
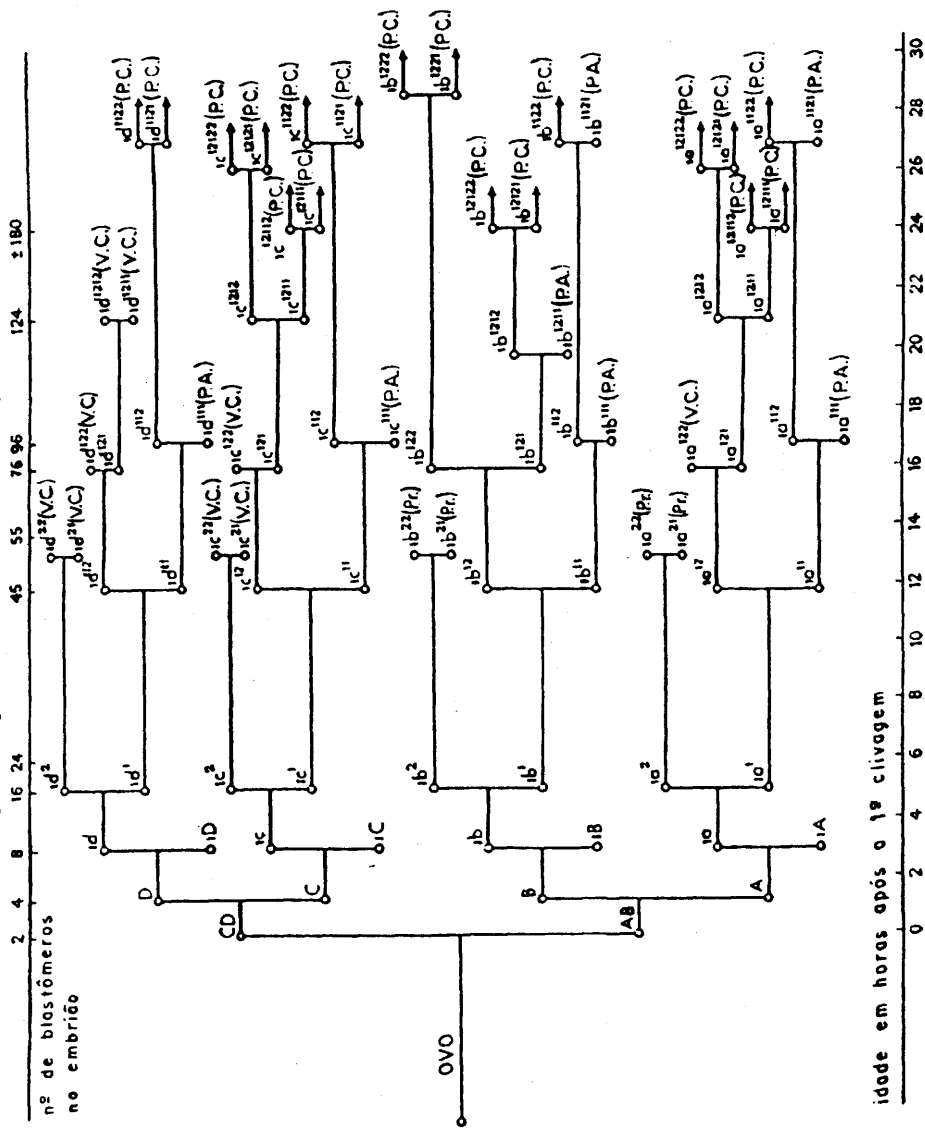
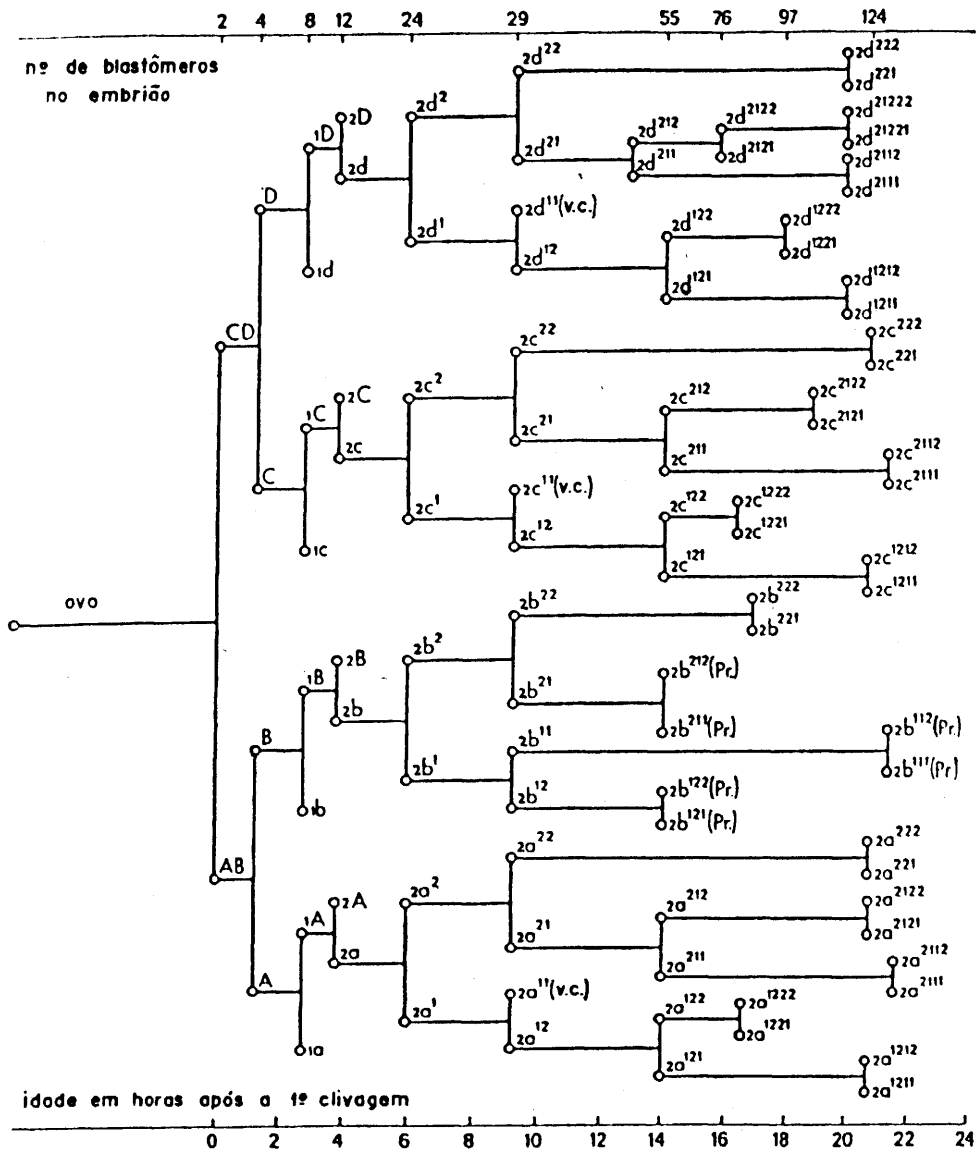


FIGURA 3: Desenvolvimento do primeiro quarteto de micrômeros (Embriologia, T. Kawano)



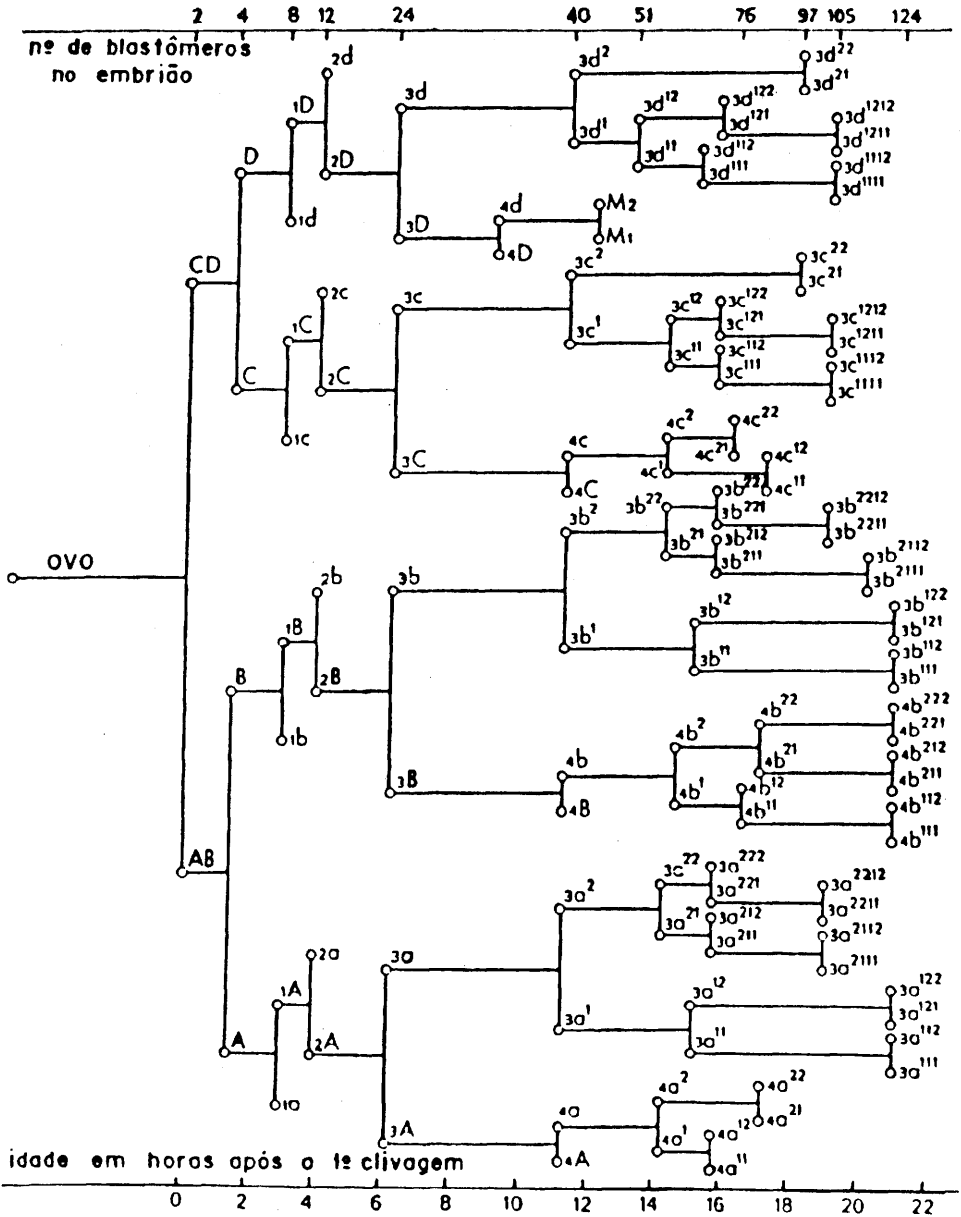
TÓPICOS EM MALACOLOGIA MÉDICA

FIGURA 4: O desenvolvimento do segundo quarteto de micrômeros (Embriologia, T. Kawano)



EMBRIOLOGIA

FIGURA 5: O desenvolvimento do terceiro e quarto quarteto de micrômeros (Embriologia, T. Kawano)



TÓPICOS EM MALACOLOGIA MÉDICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGGELAAR, J. A. M. van den, 1971. Development of division synchrony and bilateral symmetry in the first quartet of micromeres in eggs of *Lymnaea*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 26: 393-399.
- BOON-NIERMEIJER, E. K., 1987. *Responses of a developing organism upon heat stress*. Ph. D. Thesis, Utrecht: University of Utrecht.
- CAMEY, T., 1968. *Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário da Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- CAMEY, T. & VERDONK, N. H., 1970. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Netherlands Journal of Zoology*, 20: 93-121.
- DONGEN, C. A. M. van, 1976. *The development of Dentalium with special reference to the significance of the polar lobe*. Ph. D. Thesis, Utrecht: University of Utrecht.
- KAWANO, T.; OKAZAKI, K. & RÉ, L., 1992. The principal stages of the embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae): practical guide. *Malacologia*, 34: 33-40.
- LONGO, F. J., 1976. Ultrastructural aspects of fertilization in spiralian eggs. *American Zoologist*, 16: 375-394.
- RAVEN, C. P., 1945. The development of the eggs of *Limnaea stagnalis* L. from oviposition till first cleavage. *Archives Neerlandaises de Zoologie*, 7: 91-121.
- , 1946. The development of the eggs of *Limnaea stagnalis* L. from the first cleavage till the trochophore stage, with special reference to its' chemical embryology. *Archives Neerlandaises de Zoologie*, 7: 353-434.
- , 1949. On the structure of cyclopic, synophthalmic and anophthalmic embryos, obtained by the action of lithium *Limnaea stagnalis*. *Archives Neerlandaises de Zoologie*, 8: 1-30.
- , 1958. *Morphogenesis: The analysis of molluscan development*. London: Pergamon Press.
- SCOTT, F. G., 1994. *Developmental Biology*. 4th Edition, Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers.
- VERDONK, N. H., 1965. *Morphogenesis of the head region in Limnaea stagnalis L.* Ph.D. Thesis, Utrecht: University of Utrecht.
- VERDONK, N. H. & CATHER, J. N., 1983. Morphogenetic determination and differentiation. In: *The Mollusca, Vol. 3. Development* (N. H. Verdonk, J. A. M. van den Biggelaar & A. S. Tompa, eds.), New York: Academic Press.
- WIERZEJSKI, A., 1905. Embryologie von *Physa fontinalis* L. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 83: 502-706.

Toshie Kawano (Camey) – Pesquisador Científico
Laboratório de Malacologia – Instituto Butantan
CX. Postal 65 – CEP 01051 – São Paulo. SP.