



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**BÁRBARA BROOKLYN TIMÓTEO NASCIMENTO SILVA**

**Aspectos imunológicos do caramujo *Pomacea lineata* (Spix, 1827)  
sob condições de estivação induzida**

**RECIFE**

**2014**

**BÁRBARA BROOKLYN TIMÓTEO NASCIMENTO SILVA**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO CARAMUJO *POMACEA LINEATA* (SPIX, 1827)  
SOB CONDIÇÕES DE ESTIVAÇÃO INDUZIDA**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Ciência Animal Tropical da Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, como um dos  
pré-requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Ciência Animal Tropical.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Co-orientadora:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valéria Wanderley Teixeira**

**RECIFE**

**2014**

Ficha Catalográfica

S586a Silva, Bárbara Brooklyn Timóteo Nascimento  
Aspectos imunológicos do caramujo *Pomacea lineata*  
(Spix,  
1827) sob condições de estivação induzida / Bárbara  
Brooklyn  
Timóteo Nascimento Silva. -- Recife, 2014.  
58 f.: il.

Orientador (a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

Animal,

Recife, 2014.  
Referências.

nítrico  
1. *Pomacea lineata* 2. Estivação 3. Hemócitos 4. Óxido  
5. Fenoloxidase 6. Proteínas totais. I. Teixeira, Álvaro Aguiar  
Coelho, orientador II. Título

CDD 591.4

**BÁRBARA BROOKLYN TIMÓTEO NASCIMENTO SILVA**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO CARAMUJO *POMACEA LINEATA* (SPIX, 1827)  
SOB CONDIÇÕES DE ESTIVAÇÃO INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Ciência Animal Tropical da Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, como um dos  
pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre  
em Ciência Animal Tropical.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira - UFRPE

---

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena- UFRPE

**Aos meus pais maravilhosos e ao meu amado e querido esposo Pablo, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

“Aqueles que conheceram vosso Nome confiarão em vós, porque, Senhor, jamais abandonais quem vos procura” (Salmos 9, 11).

A Ti Senhor, por teu amor incondicional, por tua proteção e por ser meu Rochedo, meu Deus em quem eu confio. Obrigada Senhor por estar sempre ao meu lado, em todos os momentos, especialmente aqueles em que eu me senti só e Tu estavas comigo, me confortando e dando forças para continuar;

Aos meus amados pais, Brenio Soares e Marinalva Timóteo, por seu amor, apoio, confiança, por sempre me incentivar e permanecer comigo. Sem vocês eu não teria conseguido e sei que a presença de vocês é essencial para a minha vida. Amo-os demais e louvo a Deus por ter escolhido para mim os melhores pais que eu poderia ter;

Ao meu esposo, Pablo Henrique, por ter me acompanhado desde a época do vestibular. Lembro o dia em que me desesperei e foi você meu amor que veio me confortar e naquele abraço tirei forças pra continuar e hoje aqui estou. Obrigada por ser tão compreensivo, me ajudando no que eu precisei e por ser este esposo tão maravilhoso, ao seu lado sei que me tornei uma pessoa melhor. Você sabe: Eu te amo;

A minha irmãzinha, Barbarella Brinskyn, por ter sido minha amiga e exemplo de dedicação e inteligência;

A minha tia Giane Soares pelo incentivo e por sempre me apoiar;

Aos meus orientadores, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira pela oportunidade de ser sua orientanda. Pela acolhida e confiança, pelos ensinamentos e exemplo profissional desde a graduação;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela oportunidade e concessão do local para a realização deste trabalho;

A professora Marleyne Accioly Lins Amorim, por ter sido mais que uma coordenadora, uma amiga. Pelo profissionalismo e dedicação que exerces tua função. Obrigada por ter me apoiado e confiado em mim;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;

Ao professor Luiz Carlos Alves (FIOCRUZ) e a Elverson por ter contribuído positivamente neste trabalho, me recebendo de portas abertas e compartilhando conhecimentos;

A Gyl Everson, por ter me dado a luz que eu procurava. Por ter me incentivado e sempre apoiado esta pesquisa. Obrigada mesmo, se não fosse você, talvez não estaria concluindo esta importante etapa da minha vida e iniciando outra;

A Franklin Magliano, por ter me ajudado muito nas análises e sempre ter me incentivado para o sucesso desta pesquisa com sua experiência acadêmica. Sou muito grata por teres dedicado o teu tempo aos meus aruás;

Aos amigos do laboratório que sempre me ajudaram quando precisei e tornaram os dias mais leves e divertidos na rotina do laboratório. Por terem me ensinado e apoiado constantemente;

A todos os funcionários da Estação de Aquicultura Continental Johei Koike – UFRPE, por sempre me ajudarem na coleta dos animais e se disponibilizarem em me avisar quando tinha mais caramujos nos tanques;

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão desta pesquisa, muito obrigada!

## RESUMO

*Pomacea lineata* (Spix, 1827) é um gastrópode pulmonado que apresenta uma grande dependência da umidade, pertencente à família Ampullaridae cuja distribuição geográfica inclui quase toda a Região Neotropical, na qual habita águas de curso lento e estagnadas. Gastrópodes pulmonados apresentam uma característica ecológica conspícua, a estivação, que é uma forma de resistência e adaptação provavelmente melhor definida como uma estratégia de sobrevivência para lidar com as condições áridas, mas também é tipicamente associada com a falta de disponibilidade de alimentos e, frequentemente, com as altas temperaturas ambientais. Durante estes períodos de estivação alguns aspectos fisiológicos podem ser alterados, pois nos moluscos, a maioria desses, é dependente da temperatura e podem ser alterados pela sua variação, incluindo a atividade do sistema imunitário. O sistema imunológico inato dos invertebrados envolve a resposta celular e humoral similarmente ao encontrado nos vertebrados. As defesas celulares ocorrem em combinação com as defesas humorais. As respostas humorais, incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) e a atividade da enzima fenoloxidase, e as reações imunes celulares são realizadas pelos hemócitos, que executam, dentre outras funções, o encapsulamento e fagocitose do patógeno. Assim, esta pesquisa teve por objetivo obter informações sobre alguns parâmetros imunológicos do caramujo *P. lineata* em condições de estivação induzida. Os caramujos foram induzidos à estivação através da retirada gradual de água no aquário e abstenção de alimento, ficando nestas condições por 60 dias. Após este período, hemolinfa de 40 indivíduos foram coletadas para as análises de contagem total de hemócitos, dosagem de óxido nítrico, atividade da fenoloxidase e proteínas totais. Os resultados revelaram que os animais estivantes apresentavam um



aumento significativo no número total de hemócitos e na dosagem de óxido nítrico, o que pode conferir maior chance de sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: *Pomacea lineata*, gastropóda, estivação, hemolinfa, imunidade celular, imunidade humoral.

## ABSTRACT

*Pomacea lineata* (Spix, 1827) is a pulmonate gastropod that has a large dependence on humidity, Ampullaridae belongs to the family whose geographic distribution includes almost all the Neotropical Region, which inhabits waters of course slow and stagnate. Pulmonate gastropods have a conspicuous ecological feature, aestivation, which is a form of resistance and adaptation probably best defined as a survival strategy to cope with the arid conditions, but is also typically associated with lack of food availability, and often with high ambient temperatures. During these periods of aestivation some physiological aspects can be changed, as in molluscs, most of these is temperature dependent and can be altered by its variation, including the activity of the immune system. The innate immune system of invertebrates involves humoral and cellular response similar to that found in vertebrates. The cellular defenses occurs in combination with humoral defenses. Humoral responses include the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and phenol oxidase enzyme activity, and cellular immune reactions are performed by hemocytes, performing, among other functions, encapsulation and phagocytosis of the pathogen. Thus, this research aimed to obtain information on some immunological parameters snail *P. lineata* in conditions of induced aestivation. The snails were induced to aestivation through the gradual withdrawal of water in the aquarium and abstention from food, getting in these conditions for 60 days. After this period, hemolymph of 40 individuals were collected for analysis of the total haemocyte count, measurement of nitric oxide, phenol oxidase activity and total protein. The results revealed that animals under aestivation showed a significant increase in the total number of

hemocytes and measurement of nitric oxide, which may confer greater chance of survival.

KEYWORDS: *Pomacea lineata*, Gastropoda, aestivation, hemolymph, cellular immunity, humoral immunity.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Contagem total (média  $\pm$  D.P.) de hemócitos em caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação (n=10 caramujos/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo t-teste ( $\alpha = 0,05$ , n = 10 caramujos/tratamento)..... 57
- FIGURA 2:** Dosagem de óxido nítrico (NO) na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação (n= 10 caramujos/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo t-teste ( $\alpha = 0,05$ , n = 10 caramujos/tratamento)..... 57
- FIGURA 3:** Atividade da fenoloxidase [medida de densidade óptica (DO) a 490 nm] na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação como função do tempo (n= 10 caramujos/tratamento)..... 58
- FIGURA 4:** Médias das dosagens de proteínas totais na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação (n= 10 caramujos/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo t-teste ( $\alpha = 0,05$ , n = 10 caramujos/tratamento)..... 58

## SUMÁRIO

CAPÍTULOS		PÁG.
I	1. INTRODUÇÃO.....	14
	2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
	2.1 Filo Mollusca.....	16
	2.2 <i>Pomacea lineata</i> e sua importância.....	18
	2.3 Estivação.....	21
	2.4 Reserva energética.....	23
	2.5 Sistema imunológico dos moluscos.....	24
	2.5.1 Imunidade celular.....	24
	2.5.2 Imunidade humoral.....	27
	3. REFERÊNCIAS.....	29
II	Aspectos imunológicos do caramujo <i>Pomacea lineata</i> (Spix, 1827) sob condições de estivação induzida.....	39
	Introdução.....	40
	Material e métodos.....	42
	Resultados.....	45
	Discussão.....	47
	Conclusão.....	52
	Referências.....	52

# CAPÍTULO I

## 1- INTRODUÇÃO

A espécie *Pomacea lineata* (Spix, 1827), caramujo popularmente conhecido como aruá (BARBOZA; ROMANELLI, 2004), pertence ao Filo Mollusca (Classe Gastropoda) que possui em torno de 50.000 espécies vivas, dentre estas, 30.000 são gastrópodos. Além disso, conhecem-se cerca de 35.000 espécies fósseis, pois o filo tem uma longa história geológica, onde os registros fósseis datam do período Cambriano. *P. lineata* insere-se na subclasse Pulmonata onde encontramos caracóis muito bem sucedidos que apresentam uma característica distintiva que é a conversão da cavidade do manto em um pulmão. Pertence à Família Ampullaridae, caracterizada por apresentar hábito anfíbio, já que possui ctenídeos (brânquias primitivas monopectinadas) (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). O nome aruá em tupi-guarani quer dizer o mesmo que caracol. Esta espécie é amplamente distribuída pela América do Sul (BARBOZA; COSTA; ROMANELLI, 2006). No Brasil as espécies de moluscos do gênero *Pomacea* apresentam distribuição setentrional e litorânea, observando-se em habitats dulcícolas desde o Nordeste até o Sudeste do país (THIENGO, 1995).

Uma característica ecológica conspícua dos moluscos pulmonados é a grande dependência da umidade, que se reflete no comportamento, período de atividade, preferência por habitat, atividade reprodutiva e parece ter sido uma das principais pressões seletivas que atuaram sobre esse grupo (ELWELL; ULMER, 1971; DIMITRIEVA, 1975; PIERI; JURBERG, 1981). De uma forma geral, os gastrópodos pulmonados apresentam um grande poder de resistência e adaptação. Uma forma de resistência e adaptação é a estivação, um estado de torpor aeróbico que é provavelmente melhor definida como uma estratégia de sobrevivência para lidar com as condições áridas, mas também é tipicamente associada com a falta de disponibilidade de alimentos e, frequentemente, com as altas temperaturas ambientais (PINDER; STOREY; ULTSCH, 1992; ABE, 1995).

Dentre os fatores que interferem no ciclo de vida dos moluscos pulmonados, a temperatura também apresenta grande importância, por afetar a produção de gametas, o desenvolvimento embrionário, a taxa de eclosão de filhotes, o crescimento, a sobrevivência e o comportamento desses animais (VAN DER

SCHALIE; BERRY, 1973; DIMITRIEVA, 1975; SIEFKER; CARTHER; BLANKESPOOR, 1977; RAUT; AMED; RAUT, 1991; RAUT; RAHMAN; SAMANTA, 1992; FURTADO, 2002). Os efeitos da temperatura sobre os aspectos da biologia dos moluscos terrestres relacionam-se ao equilíbrio hídrico desses animais. Dessa forma, as respostas fisiológicas e comportamentais dos moluscos a altas temperaturas estão vinculadas também ao fator umidade.

Os elementos críticos para a sobrevivência a longo prazo durante a estivação são a retenção de água e reservas de nutrientes suficientes. Em relação ao aspecto comportamental, as espécies procuram locais protegidos, que irão ajudá-las a conservar a água corporal, minimizar a exposição delas aos elementos naturais e escondê-las dos predadores. Animais estivadores também expressam adaptações fisiológicas que defendem o corpo contra a perda de água durante a dormência. Dado que a água é perdida durante a respiração e também através do epitélio/pele, os animais normalmente entram em estivação com grandes reservas de água no corpo que podem ser utilizadas para manter os tecidos hidratados. Em caracóis terrestres há secreção de muco que fixa o opérculo à abertura da concha (BARNHART, 1983). Perda de água por evaporação durante a respiração é minimizado por padrões respiratórios apnéicos, por exemplo, alguns caracóis terrestres pulmonados podem respirar apenas 2-3 vezes/h (BARNHART; MCMAHON, 1987).

A maioria dos processos fisiológicos nos moluscos são dependentes da temperatura e podem ser alterados pela sua variação, incluindo a atividade do sistema imunitário (COTEUR; CORRIERE; DUBOIS, 2004). O sistema imunológico inato dos invertebrados envolve a resposta celular e humoral similarmente ao encontrado nos vertebrados (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). As defesas celulares ocorrem em combinação com as defesas humorais (DUNN, 1986). As respostas humorais, incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO) (PIPE, 1992), atividade da enzima fenoloxidase, secreção de proteínas antimicrobianas (MITTA et al., 2000), e as reações celulares, pelos hemócitos, que executam, dentre outras funções, o encapsulamento e fagocitose do patógeno (SMINIA; VAN DER KNAAP, 1987; COCIANCICH et al., 1994; LAVINE; STRAND, 2002;).

Embora a imunidade dos moluscos venha sendo estudada nas últimas décadas, o conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares de defesas

imunitárias dos moluscos ainda está longe de ser compreendida (CANESI et al., 2002; PAUL, 2003; TISCAR; MOSCA, 2004; VASTA; AHMED, 2008), principalmente com relação ao comportamento desse processo durante a estivação. Assim, esta pesquisa teve por objetivo obter informações sobre alguns parâmetros imunológicos do caramujo *P. lineata* em condições de estivação.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Filo Mollusca

Os membros do Filo Mollusca estão entre os invertebrados mais evidentes e familiares e incluem formas tais, como os mariscos, as lulas, os polvos e os caramujos. Este filo abrange sete classes: Monoplacophora (possuem uma única concha simétrica), Polyplacophora (conhecidos por quítons, tem corpo oval e é coberto não apenas por uma placa de concha única, mas de oito placas sobrepostas), Aplacophora (pequenos animais de corpo vermiforme), Gastrópoda (maior classe do filo, com conchas espirais assimétricas, incluem caracóis, caramujos e lesmas), Pelecypoda ou Bivalvia (concha composta por duas valvas, como os mexilhões, ostras e mariscos), Scaphopoda (moluscos marinhos escavadores e que apresentam a concha em forma de tubo cilíndrico alongado, conhecidos por conchas-presas ou dentes) e Cephalopoda (animais de maior porte dentre os invertebrados, onde a cabeça projeta-se em um círculo de grandes tentáculos ou braços preenseis, são os náutilos, sépias, lulas e polvos) (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

O interesse no estudo dos moluscos se deve, tal como no caso de muitos outros animais, à sua participação na manutenção do equilíbrio ecológico da natureza, como por exemplo, seu papel na reciclagem de detritos (DEYRUP-OLSEN; MARTIN, 1987). O filo Mollusca é considerado o segundo maior em número de espécies após os Arthropoda. Na costa brasileira, estão registradas cerca de 1.600 espécies marinhas. Devido à presença de conchas calcárias, o grupo está amplamente representado no registro fóssilífero que data desde o Cambriano. Os moluscos são invertebrados com grande capacidade adaptativa, estando representados nos mais variados tipos de ambiente e com hábitos os mais diversos.



A maioria das espécies é marinha: alguns gastrópodes e bivalves atingiram o ambiente de água doce e apenas parte dos primeiros alcançaram o ambiente terrestre. Há grupos de gastrópodes e bivalves comensais e gastrópodes endoparasíticos, estes últimos muito modificados, sendo reconhecidos como moluscos pelas características larvais (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002).

Os caracteres que definem a monofilia de Mollusca são: celoma reduzido, sistema circulatório aberto, presença de manto com espículas calcárias e rádula. O celoma restringe-se às regiões do coração, gônadas e rins. O manto é uma área ampla de epitélio dorsal com cutícula engrossada, que produz espículas ou uma ou mais conchas calcárias. A rádula localiza-se na cavidade bucal e é formada por um cinturão de dentes quitinosos curvos, tendo como principais funções a raspagem e a coleta de alimentos. Outros caracteres também são reconhecidos na maioria dos representantes desse grupo. Um deles é a presença de uma concha produzida pelo manto, que se completamente desenvolvida, recobre a maior parte do corpo do animal, protegendo-o contra predadores. Outro caráter, o pé, assemelhando-se a uma ampla sola rastejadora ventral, recoberta por epitélio ciliado e glândulas mucosas, que produzem muco que lubrifica a superfície auxiliando a locomoção (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002).

São animais que exibem virtualmente todos os tipos de hábitos alimentares: herbívoros, carnívoros, consumidores de detritos e de suspensão e parasitas. No entanto, algumas generalizações podem ser feitas como a utilização da rádula para raspar o alimento (com exceção da classe Bivalve que são filtradores), a digestão é extracelular graças às enzimas digestivas presentes nas glândulas salivares, bolsas esofágicas e divertículos digestivos. O sistema sanguíneo vascular é uma hemocele. O sangue flui das brânquias para um (ou mais) aurículas. A partir de casa aurícula, o sangue passa pelo ventrículo central que o bombeia através da aorta para a distribuição aos seios teciduais. O coração é circundado por uma cavidade celômica (cavidade pericárdica) que recebe um ultrafiltrado de sangue. O sistema nervoso consiste de uma anel nervoso, a partir do qual se estende um par de cordões nervosos podais e um par de cordões viscerais. Os órgãos sensoriais típicos são os tentáculos, os olhos, os estatocistos e um ou dois osfrádios na cavidade do manto (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

## 2.2 *Pomacea lineata* e sua importância

A espécie *P. lineata* é um gastrópode da família Ampullariidae, também conhecida como os ampularídeos tropicais (MELO et al., 2000), habita zonas baixas das margens dos rios, riachos, lagos e pântanos de águas calmas. A espécie *P. lineata* pode ser amplamente encontrada no continente sul-americano, mas encontra-se dispersa na região Nordeste do Brasil (GUIMARÃES, 1981). Apresentam concha de tamanho médio, de coloração castanho-esverdeada, ornamentada com faixas espirais escuras; espira geralmente curta; opérculo córneo. O pé tem a forma de escudo e sua coloração pode variar de cinza escuro à amarelada (THIENGO, 1995).

Os representantes do gênero *Pomacea* no Brasil são conhecidos popularmente como aruá, aruá-do-banhado, aruá-do-brejo, caramujo-do-banhado, fuá e arauá (IHERING, 1968; SANTOS, 1982). Além de *P. lineata* há um amplo número de espécies incluídas neste gênero, tais como: *P. canaliculata* (Lamarck, 1804), *P. bridgesii* (Reeve, 1856), *P. paludosa* (Say, 1829), *P. sordida* (Swainson, 1823), *P. aulanieri* (Hupé & Deville, 1850), *P. columellaris* (Gold, 1848), *P. curumim* (Simone, 2004), *P. decussata* (Moricand, 1836), *P. diffusa* (Blume, 1957), *P. dolioides* (Blume, 1957), *P. glauca* (Linnaeus, 1758), *P. guyanensis* (Lamarck, 1819), *P. haustum* (Reeve, 1856), *P. maculata* (Perry, 1810), *P. meta* (Ihering, 1915), dentre outras.

Possuem sexos separados (dióicos), cujos machos possuem um pênis que se origina na borda direita do manto e aloja-se num saco basal, denominado saco ou bolsa do pênis, isto permite a distinção dos sexos na dissecação (MESQUITA; COELHO; SANTOS, 1990). Os machos são geralmente menores que as fêmeas e estas últimas iniciam a ovoposição 24 horas após a cópula e as desovas são sempre postas acima do nível da água (THIENGO, 1995). Nas fêmeas, o ovário, também conhecido por glândula de albumina, é constituído por túbulos ramificados branco-amarelados, situados superficialmente sobre a glândula digestiva (THIENGO, 1987).

A reprodução é a garantia da continuidade de uma espécie no ambiente, e para os moluscos terrestres esta função vital é continuada pela deposição de ovos nas margens e substratos dos habitats aos quais os encontramos (THIENGO, 1987). A glândula de albúmen representa uma grande importância no desenvolvimento de caramujos terrestres, visto que este órgão é responsável pela produção de ovos,

fazendo parte do sistema reprodutor feminino e está envolvida no processo de reprodução (THIENGO, 1995). Quando em estágio de maturação a glândula apresenta uma cor alaranjada e tem tamanho variado, mas de forma geral é bem volumosa (CARREÓN-PALAU et al., 2003). As fêmeas maduras depositam uma massa brilhante de 400-600 ovos de cor alaranjada, que pode ser facilmente visualizada na vegetação emergente, estruturas e rochas acima do nível da água ao longo do ambiente onde estes animais são encontrados (COLER et al., 2005). À medida que vão amadurecendo, a cor torna-se mais clara, atingindo uma tonalidade esbranquiçada, quando próximo à eclosão. Esta ocorre, geralmente, 15 dias após a ovoposição, em uma temperatura média de 25°C (THIENGO, 1995).

No que concerne a importância ecológica, a espécie *P. lineata* é útil para o avanço das diretrizes de qualidade de água para proteger a biota aquática (DAS; KHANGAROT, 2010), exercem um papel importante na “limpeza natural” do leito dos rios e outros corpos de água (PAULINI; PAULINI, 1971). Segundo Marques e Barbosa (2001), moluscos estão entre os macroinvertebrados bioindicadores uma vez que são sensíveis à poluição e variações do habitat. Nos anos 60 surgiram as primeiras tentativas de quantificar o grau de poluição levando em conta a incidência de uma determinada espécie e sua tolerância à poluição. Também atuam como controladores biológicos naturais do *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (CIMERMAN; CIMERMAN, 2005). É importante destacar ainda que esta espécie também possui grande importância na cadeia alimentar, pois serve de alimento para peixes, anfíbios, répteis, entre outros animais (PAULINI; PAULINI, 1971), além de também servirem como alimento humano (STORER et al., 2003).

Várias pesquisas também apontaram a importância do gênero *Pomacea* no monitoramento da qualidade de águas no Nordeste do Brasil (COLER et al., 2005). Melo et. al. (2000) desenvolveram o *P. lineata* como um organismo teste de toxicidade aguda em emissários de uma fábrica utilizando neonatos, semelhante ao trabalho de Melo (2000) que usou a mesma espécie como organismo teste de toxicidade em mananciais de água doce e Batalla (1997) que estudou o efeito de toxicidade ao herbicida “paraquat” na resistência do caramujo. Outra pesquisa utilizando esta espécie foi o de Pessôa et al. (2007) que além de avaliar a toxicidade aguda, observou os efeitos citotóxico e espasmolítico tanto no molusco quanto na sua desova.

Houve também efeitos dramáticos na introdução de caramujos, tanto em habitats naturais como em áreas agrícolas no Sudeste Asiático, (RAWLINGS et al., 2007) pois estes animais são considerados como pragas agrícolas em plantações de arroz no Oriente (COLER et al., 2005). Os membros de gastrópodes de água doce da família Ampullariidae, conhecido como caramujos, tem um histórico impressionante de espécies invasoras. Espécies de três gêneros, *Pila*, *Pomacea* e *Marisa*, têm demonstrado uma capacidade tenaz para sobreviver e se espalhou rapidamente nos habitats de água doce em que tenham sido introduzidas (COWIE, 1995; HALE, 1964).

No que se refere aos moluscos, o significativo papel que esses invertebrados desempenha(ram) em muitas civilizações está expresso em diversos contextos sócio culturais, como religião, mitologia, cerâmica, pintura, escultura, arquitetura, literatura e economia (ALVES; SOUZA, 2000; MATOS, 2005; NARANJO- GARCIA, 1994). Na medicina, o animal inteiro ou os produtos e substâncias dele extraídos têm sido utilizados como recursos terapêuticos em diferentes culturas humanas desde tempos antigos (COSTA NETO, 2006b). Sobre o uso medicinal do aruá (*Pomacea* sp.), Nomura (1996) relatou na Inglaterra do século XVIII, que o molusco era consumido principalmente para dissolver cálculos renais e no Nordeste brasileiro, e na Argentina contra a disenteria e quando aplicados como emplastro, acredita-se que ajudam na cicatrização de feridas (SANTOS, 1982). Relata-se ainda, a aplicação local desse animal para tratar hemorróidas (LAGES; FILHO, 1934).

Os ovos desse gastrópode também são bastante empregados na medicina, no tratamento da luxação dos pés, disenteria e doenças respiratórias. Sua desova é utilizada no Nordeste brasileiro como remédio contra as doenças do peito (SANTOS, 1982) e no preparo de um lambedor que serviria para tratar acessos de tosse (LAGES; FILHO, 1934). Registros locais também indicam que na comunidade de Várzea da Marituba, baixo São Francisco alagoano, o uso da desova de *P. lineata* para tratar “carnegão” (abscesso) (MARQUES, 1995) e no povoado de Remanso, Chapada Diamantina, (COSTA NETO, 2000) e recomendava a desova no tratamento de torções, inchaços nos pés e asma. O tratamento para a asma com a desova deste molusco também foi estudada por Branch; Silva (1983).

Entre os animais com um elevado potencial como fonte de alimentos podem ser encontrados moluscos do gênero *Pomacea*, que são ricos em proteínas, hidratos

de carbono, gordura, glicogênio e aminoácidos essenciais (GUIMARÃES, 1981). Este autor também registra que a hemolinfa desse gastrópode é rico em cálcio; por conseguinte, poderia receitá-la contra o raquitismo e a baba (muco), tinha o poder de cura contra verrugas e manchas de pele, bem como dores de cabeça e acidez gástrica. Na indústria, Barboza; Romanelli (2004) em seu estudo concluíram que as farinhas de vísceras produzidas a partir dos moluscos *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) e *P. lineata* podem ser utilizadas como matérias primas, constituindo-se ótimas fontes de nutrientes como proteínas de alto valor biológico, sais minerais e vitaminas do complexo B, considerado um ingrediente nutricional importante na elaboração de ração para animais domésticos movimentando atualmente um crescente mercado.

### 2.3 Estivação

Os animais usam diversas estratégias adaptativas para suportar o estresse ambiental provocado por mudanças sazonais de temperatura, umidade, alimentos e disponibilidade de água, salinidade e concentração de oxigênio (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVIN, 2002; HERMES-LIMA et al., 2004) ou por eventos imprevisíveis (STOREY; STOREY, 2011). O comportamento agregativo (DUNDEE; TIZZARD; TRAUB, 1975); a seleção de substratos com níveis adequados de umidade para a oviposição, o enterramento desses ovos em cavidades no solo (LEAHY, 1983); a formação de espermatóforos (WIKTOR, 1987); constituição distinta das fezes usualmente formadas sobre os ovos (RAUT; PANIGRAHI, 1988); a estivação e retração da massa cefalopodal no interior da concha (ELWELL; ULMER, 1971; RICHARDOT, 1977) são algumas das estratégias que permitem a sobrevivência e o sucesso reprodutivo desses organismos, sob condições desfavoráveis de umidade (PIERI; JURBERG, 1981) com altas temperaturas e nenhuma oportunidade para a reidratação (ARAD, 1993; EMBERTON, 1994).

A estivação é um fenômeno pouco conhecido, em relação aos seus mecanismos fisiológicos, particularmente entre as espécies neotropicais. Alguns estudiosos denominam tal capacidade de adaptação como “sono de verão” ou dormência na estação seca (STOREY; STOREY, 2012), uma referência ao estado de dormência que algumas espécies, tanto de vertebrados como de invertebrados,

assumem em resposta às temperaturas ambientais elevadas ou ao perigo de desidratação, ou ambos, podendo estar associado com uma depressão metabólica profunda (GUPPY; WITHERS, 1999; ROJAS et al., 2000). Adaptações fisiológicas e bioquímicas na estivação têm sido estudadas em várias espécies e são particularmente bem pesquisadas em peixes pulmonados, sapos, várias espécies de caracóis terrestres e também em alguns insetos (STOREY, 2002).

Segundo Storey (2002) durante a estivação, os moluscos não se alimentam e as suas reservas de energia são utilizadas apenas para sustentar o metabolismo basal. Conseqüentemente, não há energia disponível para o crescimento. Moreno-Rueda (2008) mostrou que durante a estivação ocorre perda de peso. Condições áridas que restringem a disponibilidade de água e de alimentos são o gatilho comum para estivação, quase sempre acompanhado por altas temperaturas do verão. Os principais fatores necessários para o sucesso na estivação envolvem água: conservação de água do corpo, ajustes para lidar com a restrição de água e, às vezes mudança para a manipulação de produtos finais nitrogenados (STOREY; STOREY, 2012).

Forte depressão da taxa metabólica durante a estivação minimiza o uso de energia para prolongar o tempo total de sobrevivência, mas isto também significa que a síntese e degradação é muito reduzida, de modo que as estratégias de preservação são necessárias para estender os seus tempos de vida funcional. Este é fornecido por meio de mecanismos, incluindo avançadas defesas antioxidantes, estratégias que são componentes bem conhecidos da resposta ao estresse (KÜLTZ, 2005). A estivação não é necessariamente desencadeada apenas por fatores ambientais, pois quando expostos a luz artificial constante, o anfíbio *Scaphiopus couchii* (Baird, 1854) entra em dormência e espontaneamente, deixam de se alimentar na fase em que estariam em estivação (PINDER; STOREY; ULTSCH, 1992).

Adaptações fisiológicas e comportamentais das mais variadas são encontradas na fauna de água doce, com o intuito de resistir às secas intermitentes. Segundo Abílio et al. (2007) e Willians (2006) nos gastrópodes o opérculo veda completamente a abertura da concha em alguns animais, como no *P. lineata*; há o desenvolvimento de pseudo-brânquias e produção de lamelas vedando a concha, como no *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848); espécies de *Melanoides*

*tuberculata* (Miffler, 1774) escavam o sedimento e permanecem em estivação. Em outros organismos, como os Oligochaeta, eles produzem ovos de dormência, enquanto que os ovos são de resistência. Alguns Artrópodes, como os insetos também desenvolvem estratégias de sobrevivência, tais como a produção de ovos de resistência e a escavação do sedimento, garantindo assim a continuidade da espécie após o período de seca.

#### 2.4 Reserva energética

De acordo com a literatura, a umidade também influencia aspectos do ciclo de vida dos moluscos, tais como, os níveis de carboidratos, de proteínas e de lipídeos. Como em todo animal, nos gastrópodes a alimentação é fator primordial para a sobrevivência. Sem ela, o animal fica impossibilitado de manter a funcionalidade normal de seus órgãos e realizar atividades vitais, tais como espermatogênese, a produção e incubação dos ovos, locomoção e batimentos cardíacos (COOK, 2001; FURTADO; BESSA; CASTANON 2002; D'ÁVILA; BESSA 2005). Nos períodos de estivação ocorre a degradação das proteínas em aminoácidos para síntese das proteínas essenciais, e em cetoácidos, para a gliconeogênese, mantendo assim as concentrações de glicose em níveis vitais (BAYNES; DOMINICZAK, 2000).

Quando em estivação os moluscos apresentam redução das reservas de carboidratos, passando a utilizar outros substratos para a obtenção de energia (PINHEIRO, 1996), já que é necessário manter o metabolismo basal (STOREY, 2002). Lira et al. (2000) observaram que no período de 30 dias em estivação, a concentração de proteínas no organismo de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821), caracol nativo da Ásia e bastante encontrado em jardins, mostrou uma tendência a decrescer, atingindo valores 70% abaixo do normal, indicando que o molusco estava metabolizando proteínas. Ainda em *B. similis*, Pinheiro (1996) observou que os níveis das reservas de carboidratos reduzem nos períodos de estivação sugerindo a utilização de outras fontes energéticas, como proteínas e lipídeos. Estes recursos são mobilizados durante os períodos de privação de alimento e/ou estresse ambiental (WILLIAMS, 1970).

Durante períodos prolongados de estivação, os nutrientes armazenados anteriormente são metabolizados, sendo o carboidrato, o primeiro destes materiais a

ser utilizado (ROSSI; SILVA, 1993; DA SILVA; ZANCAN, 1994). Quando este metabólito é esgotado, o animal mobiliza reservas lipídicas e, finalmente, as proteínas são usadas como último recurso (MATSUZAWA et al. 1991). É importante ressaltar que o intenso catabolismo das proteínas relatado por Becker (1993) leva ao aumento na produção de ureia na excreção dos caramujos. Maciel (2013) concluiu em seu estudo que em *P. lineata* a metabolização de proteínas é proporcional ao período de estivação, para síntese de carboidratos e excreção de ácido úrico, garantindo a integridade do aparelho reprodutor e da gametogênese.

Balan et al. (1993) observaram que os valores de proteínas totais de hemolinfa mostraram-se maiores nos moluscos *B. tenagophila* sem infecção mantidos em laboratório, quando comparados com os capturados no campo livres de infecção por trematódeos. Acrescentando que esses valores não estão aumentados nos caramujos de campo naturalmente parasitados, ou mesmo nos caramujos experimentalmente infectados com *S. mansoni*. Loker; Hertel (1987) evidenciaram diferenças na quantidade de proteína total na hemolinfa de *B. glabrata*, parasitado por *Echinostoma paraensei*, sendo que esse valor aumenta muito nos caramujos susceptíveis. Nos exemplares não infectados, o valor protéico foi maior que nos exemplares infectados por *S. mansoni*. Quando se comparou com moluscos capturados no campo, os moluscos nascidos e mantidos em laboratório apresentaram valores maiores de proteínas na hemolinfa. Tal situação, talvez se deva a fatores como alimentação e confinamento (BALAN; MAGALHÃES; PIEDRABUENA; 1993).

## 2.5 Sistema imunológico dos moluscos

### 2.5.1 Imunidade celular

A imunidade dos gastrópodes é ainda pouco conhecida, em parte porque a maioria dos estudos foca em um segmento muito pequeno da diversidade desta classe de moluscos. A superfície macia e úmida do corpo dos gastrópodes é envolvida por um epitélio ciliado que produz muco, fornecendo uma armadilha física inicial e barreira à colonização de patógenos (VIEIRA et al., 2004). O isolamento do muco do corpo do caracol *A. fulica* (Bowdich, 1822), conhecido como gigante



africano sugere também que o muco proporciona uma barreira química. A produção regular e eliminação constante do muco no corpo do animal, provavelmente também é vantajoso na limpeza da superfície a qual eles deslizam, protegendo-os de agentes patogênicos como bactérias que são estimulados a crescer em biofilmes no muco (LOKER, 2010).

O sistema circulatório dos gastrópodes é aberto, sendo preenchido com células de defesa circulantes chamadas hemócitos (anteriormente chamado frequentemente amebócitos) que desempenham funções de fagocitose e reações de encapsulamento (MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999). O sistema imunológico dos moluscos envolve tanto respostas humorais, incluindo produção de espécies reativas de oxigênio (PIPE, 1992), atividade da enzima fenoloxidase, secreção antimicrobiana de péptido (MITTA et al., 2000), como várias reações de células imunes, altamente especializadas, os hemócitos (SMINIA; VAN DER KNAAP, 1987). Na defesa celular, os hemócitos apresentam papel central na imunidade inata. São células com morfologia e conteúdo enzimático variáveis, diferentes subpopulações, apresentam aderências diferentes e propriedades de fagocitose (VAN DER KNAAP; LOKER, 1990; MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999).

A hemolinfa dos gastrópodes normalmente contém hemócitos que não se espalham ou se espalham minimamente quando colocados em superfícies artificiais, enquanto a maioria das células normalmente espalhadas avidamente, formam projeções citoplasmáticas (filopodia ou pseudopodia), e acredita-se ser o protagonista na fagocitose e nas respostas de encapsulamento. Hemócitos de gastrópodes são caracteristicamente pegajoso e prontamente formam agregados, sendo uma tendência a ser mais pronunciada nas espécies marinhas e de água doce (LOKER, 2010).

A maioria dos estudos relataram que os hemócitos circulantes em *Biomphalaria* são compostas por, pelo menos, duas populações celulares, principalmente baseadas em características morfológicas e funcionais: hialinócitos (células de tamanho menor e sem grânulos) e granulócitos (células de tamanho maior e com grânulos) (LO VERDE; GHERSON; RICHARDS, 1982; LIE; JEONG; HEYNEMAN, 1987; BARRACCO et al, 1993). Recentemente, Cavalcanti et al. (2012) caracterizaram os hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea*

encontrando subpopulações dos hemócitos já estudados anteriormente: células blastlike (este tipo de célula pode ser considerado como células jovens ou precursoras de outros hemócitos), granulócitos, hialinócitos tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III.

Células do tipo blastlike são os menores tipo celulares encontrado na hemolinfa das duas espécies de caracóis, *B. glabrata* e *B. straminea*. Este tipo de célula também foi descrito na hemolinfa de *B. tenagophila* (BARRACCO et al., 1993) e no molusco bivalve *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) (TRAVERS et al., 2008). Os granulócitos são um tipo de célula que já foi visto na hemolinfa de *B. glabrata* (CHENG; AULD, 1977) e *B. tenagophila* (BARRACCO et al., 1993). Este tipo de célula foi também descrito em outros gastrópodes: *Turbo cornutus* (Lightfoot, 1786) (DONAGHY et al, 2010.) e *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (RUSSO; LAGADIC, 2004). Cheng; Auld (1977) foram os primeiros a relatar a presença de hialinócitos na hemolinfa de *B. glabrata*. Barracco et al. (1993) trabalhou com *B. tenagophila* e caracterizou também os hialinócitos como células de pequeno tamanho. No trabalho de Cavalcanti et al. (2012) descobriram que hialinócitos tipo I foram o segundo menor e também mais prevalente tipo celular encontrado na hemolinfa em *B. glabrata* e *B. straminea*. Estes autores também caracterizaram os hialinócitos como células de maior capacidade de aderência em relação aos granulócitos.

Após a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários, os hemócitos rapidamente migram para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (RUSSO; BREHÉLIN; CARTON, 2001; SILVA et al., 2000). Se a concentração de patógenos é muito grande, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e de removê-los da circulação (STRAND; PECH, 1995). A formação de nódulos é uma reação rápida que demanda uma mudança nos hemócitos circulantes, que passam a se comportarem como células adesivas aptas a se ligar ao alvo (LAVINE; STRAND, 2002). Também estão envolvidos no reconhecimento de corpos estranhos, respostas de encapsulamento, fagocitose e reações citotóxicas (MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999; JOHNSTON; YOSHINO, 2001). A fagocitose é um processo de defesa celular altamente conservado, constituindo a primeira resposta dos hemócitos a invasão do

organismo por partículas estranhas em pequenas concentrações (LAVINE; STRAND, 2002; STUART; EZEKOWITZ, 2008).

### *2.5.2 Imunidade humoral*

A imunidade humoral inclui espécies reativas de oxigênio, o óxido nítrico (NO-Nitric Oxide), peptídeos antimicrobianos, fenoloxidase e as cascatas que regulam a coagulação e melanização da hemolinfa (LAVINE; STRAND, 2002). O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (DUSSE et al., 2003; HIBBS JR. et al. 1988; MARLETTA et al., 1988). No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE et al., 2003). Funcionando como resposta imunológica no controle de infecções, porém devem ser produzidos de forma equilibrada, pois podem afetar as próprias células (CASTRO, 2009).

A fenoloxidase é uma enzima que catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa, o produto final dessa oxidação é a melanina, que participa de três importantes processos fisiológicos: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesas imunológicas (ASHIDA et al., 1983; BROOKMAN; ROWLEY; RATCLIFFE, 1989; MARMARAS et al., 1993; LEE et al, 1999; ROWLEY; BROOKMAN; RATCLIFFE, 1990; SILVA et al., 2000). Esta enzima é ativada proteoliticamente em resposta a infecções e antes da ativação é chamada de pro-fenoloxidase (ASHIDA et al., 1983; SILVA et al., 2000). A ativação da cascata de pro-fenoloxidase é necessária para o processo de melanização e morte dos microorganismos isolados nos nódulos ou cápsulas. Oxidações subseqüentes de fenóis pela fenoloxidase levam à produção de quinonas, que são moléculas citotóxicas que inativam ou matam grande parte dos patógenos, levando à produção de melanina (MA; KANOST, 2000).

A fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microorganismos invasores como para o próprio animal, por isso sua ativação é limitada ao local da ativação, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada e letal para o animal (KANOST,

1999). Esta enzima é fundamental na adesão hemócito-microrganismo. Um grande número de inibidores de proteases tem sido identificados na hemolinfa. Além de participarem das defesas humorais, esses inibidores inativam muitas proteases que são liberadas pelos patógenos invasores (SILVA, 2002).

Os organismos aprisionados na infecção são destruídos pelo complexo enzimático da profenoloxidase, sendo a principal enzima ativada a fenoloxidase (KURIHARA; SHIMAZU; WAGO, 1992; STRAND; PECH, 1995; RIBEIRO; SIMÕES; BREHÉLIN, 1996). A fenoloxidase constitui um dos mais importantes componentes do sistema de defesa, fazendo parte de uma cascata enzimática é ativada pelos granulócitos através da exocitose de fatores sinais, acarretando a síntese de proteínas que aumentam a adesividade e a produção de quinonas tóxicas resultando no processo de melanização que inativa ou destrói o invasor (RATCLIFFE; ROWLEY, 1987; SÖDERHÄLL, 1982; RATCLIFFE et al., 1985).

### 3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A.S. Estivation in South American amphibians and reptiles. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 28, p. 1241–1247, 1995.
- ABÍLIO, F. J. P. et al. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecol. Bras.**, v. 11, n.3, p. 397-409, 2007.
- ALVES, A. G. C.; SOUZA, R. M. de. Etnoecologia de um ambiente estuarino no nordeste do Brasil: conhecimento dos “mariscos” (Mollusca: Bivalvia) por mulheres no Canal de Santa Cruz. **Anais do MANGROVE 2000**, Recife, Brasil, CD-ROM, 2000.
- AMED, M.; RAUT, S. K. 1991. Influence of temperature on the growth of the pestiferous land snail *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae). **Walkerana**. v. 5, n. 13, p. 33-62.
- ARAD, Z. Water relations and resistance to desiccation in three Israeli desert land snails, *Eremina desertorum*, *Euchondrus desertorum* and *Euchondrus albulus*. **J. Arid. Environm.** v. 24, p. 387-395, 1993.
- ASHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; IWAHANA, H. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or b-1,3-gulcans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 113, n. 2, p. 562-564, 1983.
- BALAN, D. S. L., MAGALHÃES, L. A. PIEDRABUENA, A. E. Immunological and parasitological aspects of *Biomphalaria tenagophila* infected by *Schistosoma mansoni* and other Digenea. **Rev. Saúde Públ.**, vol. 27, n. 6, p. 421-429, 1993.
- BARBOZA, S. H. R.; COSTA, D. P. S.; ROMANELLI, P. F. Processamento e avaliação sensorial da carne dos moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*). **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 17, n. 4, p. 413-418, 2006.
- BARBOZA, S. H. R.; ROMANELLI, P. F. Estudo do aproveitamento das vísceras dos moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*) para incorporação em ração animal. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 245-250, 2004.
- BARNHART, M. C. Gas permeability of the epiphragm of a terrestrial snail. **Physiol. Zool.** v. 56, p. 436–444, 1983.
- BARNHART, M. C., MCMAHON, B. R. Discontinuous carbon dioxide release and metabolic depression in dormant land snails. **J. Exp. Biol.** v. 128, p. 123–138, 1987.
- BARRACCO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 88, p. 73–83, 1993.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquím. méd.**, Editora Manole, Cap.18; 28, pág. 218; 260, 1ed. São Paulo, 2000.

BATALLA, J. F. Efeito do herbicida Paraquat sobre o gastrópode *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Ampullariidae, Prosobranchia): Bioensaios em laboratório. Dissertação de mestrado, João Pessoa (Brazil): 137 p. 1997.

BECKER, B.F., Towards the physiological function of uric acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 14, p. 615–631, 1993.

BRANCH, L. C.; SILVA, M. F. Folk medicine in Alter do Chão, Pará, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 13, p. 737-797, 1983.

BROOKMAN, J. L.; ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. Studies on nodule formation in locust following injection of microbial products. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 53, p. 315-323, 1989.

CANESI, L. et al. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. **Microsc. Res. Tech.** v. 57, p. 469-476, 2002.

CARREÓN-PALAU, L. et al. Desarrollo morfológico e histológico del sistema reproductor de *Pomacea patula catemacensis* (Baker 1922) (Mollusca, Caenogastropoda: Ampullariidae). **Rev. Chil. Hist. Nat.**, v. 76, p. 665-680, 2003.

CASTRO, D. P. **Fatores que interferem no desenvolvimento de tripanosomatídeos em *Rhodnius prolixus*: I- Efeito de fisalinas sobre o sistema imune; II- *Serratia marcescens* isolada da microbiota intestinal.** 2009. 137f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2009.

CAVALCANTI, M. G. et al. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**. v. 43, n. 2–3, p. 285-291, 2012.

CHENG, T. C., AULD, K. R. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **J. Invertebr. Pathol.** v. 30, p. 119–122, 1977.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais.** 2ª Ed. São Paulo – Editora Atheneu, p. 212-221, 2005.

COCIANCICH, S. et al. The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasit. Today**, v. 10, p. 132-139, 1994.

COLER, R. A. et al. Applying Weight Gain in *Pomacea lineata* (SPIX 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a Measure of Herbicide Toxicity. **Braz. J. Biol.**, v. 65, n. 4, p. 617-623, 2005.

COOK, A. **Behavioural ecology: on doing the right thing, in the right place at the right time.** In: The biology of terrestrial mollusks. CABI Publishing, Oxford. (G.M. Barker, ed.), cap 13, p. 447–487, 2001.

COSTA NETO, E. M. Conhecimento e usos tradicionais de recursos faunísticos por uma comunidade afro-brasileira. Resultados preliminares. **Interciência**, v. 25, n. 9, p. 423-431, 2000.

COSTA NETO, E. M. Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importância clínico-farmacológica. **Biotemas**, v. 19, n. 3, p. 71-78, 2006b.

COTEUR, G., CORRIERE, N., DUBOIS, P. Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). **Fish Shellfish Immunol.** v. 16, p. 51-63, 2004.

COWIE, R. H. Identity, distribution and impacts of introduced Ampullariidae and Viviparidae in the Hawaiian Islands. **J. Med. Appl. Malacol.**, v. 5, p. 61-67, 1995.

DAS, S.; KHANGAROT, B. S. Efeitos do cobre sobre o desenvolvimento de ovos e eclosão de um caracol de água doce pulmonate *Lymnaea luteola* L. **J. Hazard Mater**, v. 179, p. 665-675, 2010.

DA SILVA, S. M.; ZANCAN, D. M. Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod *Megulobulimus oblongus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 108, p. 337-341, 1994.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. A. Influência de diferentes substratos e umidade sobre o crescimento e o número de ovos produzidos por *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca: Subulinidae), sob condições de laboratório. **Rev. Bras. Zool.**, v. 22, n. 2, p. 349-353, 2005.

DEYRUP-OLSEN, I.; MARTIN, W. Osmolyti processing in the gut and na important role of the rectum in the land slug., *Ariolimax columbianus* (Pulmonata, Arionidae). **J. Exp. Zool.** v. 243, p. 33-38, 1987.

DIMITRIEVA, E. F. The influence of temperature and moisture of the upper soil layer on the hatching intensity of the slug *Deroceras reticulatum* Müller. **Malacol. Review**, Ann Arbor, v. 10, p. 32-45, 1975.

DONAGHY, L. et al. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. **Fish Shellfish Immunol.** v. 28, p. 87-97, 2010.

DUNDEE, S. D.; TIZZARD, M.; TRAUB, M. Agregative behavior in veronicellide slugs. **The Nautilus**, Flórida, v. 89, n. 93, p. 69-71, 1975.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. Annual. **Review Entomol.**, v. 31, p. 321-339, 1986.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n.4, p. 343-350. 2003.

ELWELL, A. S.; ULMER, M. J. Notes on the biology of *Anguispira alternata* (Stylommatophora: Endodontidae). **Malacologia**, v. 11, n. 1, p. 199-216, 1971.

EMBERTON, K.C. Morphology and aestivation behaviour in some madagascan acavid land snails. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 53, p. 175-187, 1994.

FURTADO, M. C. V.; BESSA, E. C. A.; CASTAÑON, M. C. M. Hystological characterization of ovotestis of *Bradybaena similaris* (Férussac,1821) (Mollusca, Xanthonychidae) in different developmental phases, kept isolated or in groups, under laboratorial conditions. **Rev. Bras. Zoo.**, v. 4, n. 2, p. 229-300, 2002.

GUIMARÃES C.T. Algumas observações de campo sobre Biologia e ecologia de *Pomacea haustum* (Reeve 1856) (Mollusca, pilídeo). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 76, p. 343-351, 1981.

GUPPY, M., WITHERS, P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biol. Rev. Camb. Soc.** v. 74, p. 1-40. 1999.

HALE, M. C. **The ecology and distribution of the introduced snail, *Marisa cornuarietis*, (Ampullariidae) in South Florida.** In *MSc thesis*. University of Miami, School of Marine and Atmospheric Science, 1964.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVIN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 133, p. 537-556, 2002.

HERMES-LIMA, M. et al. **Animal adaptability to oxidative stress: gastropod estivation and mammalian hibernation.** In *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application (Twelfth International Hibernation Symposium)* (ed. B. M. Barnes and V. M. Carey), p. 585-593. Fairbanks, AK: University of Alaska, Fairbanks. 2004.

HIBBS JR., J.B., et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 157, p. 87- 94, 1988.

IHERING, R. V. **Dicionário dos Animais do Brasil.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1968, 790p.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiol.**, v. 211, n. 4, p. 213-236, 2006.

JOHNSTON, L. A.; YOSHINO, T. P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **J. Parasitol.** v. 87, p. 786-793, 2001.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, p. 291-301, 1999.



KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu. Rev. Physiol.** v. 67, p. 225-257, 2005.

KURIHARA, Y.; SHIMAZU, T.; WAGO, H. Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae): II-possible roles of granular plasmatocytes and oenocytoids in the cellular defense reactions. **Appl. Entomol. Zool.**, v. 27, p. 237-242, 1992.

LAGES FILHO, J. **A medicina popular em Alagoas**. Separata dos Arquivos do Instituto Nina Rodrigues, Salvador, Brasil, p. 27, 1934.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LEAHY, W. Comportamento e características anatomofuncionais da reprodução em *Bradybaena similaris* (Molusco pulmonado). **Ci. Cult.**, São Paulo, v. 36, n. 98, p. 1389-1392, 1983.

LEE, H.S. et al. The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. **FEBS Lett.**, v. 444, n. 2-3, p. 255-259, 1999.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D., Molluscan host reactions to helminthic infection. In: Soulsby, E.J.L (Ed.), *Protozoa, Arthropods and Invertebrates*. CRC Press Inc., **Boca Raton, FL**, p. 211–270, 1987.

LIRA, C. R. S. et al. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac) (Mollusca, Gastropoda, Xanthonychidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 17, n. 4, p. 907-913, 2000.

LOKER, E. S.; HERTEL, L. A. Alterations in *B. glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. **J. Parasitol.** v. 73, p. 503-513, 1987.

LOKER E. S. “**Gastropod immunobiology,**” in **Invertebrate Immunity**, ed. Soderhall K., editor. (AUSTIN: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media), p. 17-43, 2010.

LO VERDE, P.T., GHERSON, J., RICHARDS, C.S. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*, fine structure. **Dev. Comp. Immunol.** v. 31, p. 999, 1982.

MA, C. C.; KANOST, M. R. A beta 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta* agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 11, p. 7505- 7514, 2000.

MACIEL, G. E. S. **Análise dos níveis de carboidratos e ácido úrico na hemolinfa de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) em estivação e sua influência sobre a histologia gonadal**. 2013. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MARLETTA, M.A., et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p. 8706-8711, 1988.

MARMARAS, V. J. et al. Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonselfrecognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 23, p. 169-180, 1993.

MARQUES, J. G. W. **Pescando pescadores: etnoecologia abrangente no baixo São Francisco alagoano**. NUPAUB-USP, São Paulo, Brasil, 1995, 304p.

MARQUES, M. M.; BARBOSA, F. Na fauna do fundo, o retrato da degradação. **Ciência hoje**, v. 30, n. 175, p. 72-75, 2001.

MATOS, E. Utilização e produção de bivalves pelas populações amazônicas como alternativa econômica. **Resumos do 19º Encontro Brasileiro de Malacologia**, Rio de Janeiro, Brasil, p. 144, 2005.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.** v. 74, p. 224–234, 1999.

MATSUZAWA, Y. et al. High sucrose diet increases visceral fat accumulation in VMH-lesioned obese rats. **Int. J. Obesity**, v. 15, p. 205–211, 1991.

MELO, L. E. L. et al. Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. **Hydrobiologia**, v. 429, p. 73-78, 2000.

MELO, L. E. L. **O uso do Gastropode *Pomacea lineata* (Spix 1827) como indicador de toxicidade em mananciais de água doce no Nordeste do Brasil: Uma preposta metodológica**. Universidade Federal da Paraíba. Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente. Dissertação de Mestrado. João Pessoa-PB, 2000.

MESQUITA, E. F. M.; COELHO, A. C. S.; SANTOS, J. A. Anatomia e histologia do aparelho reprodutor masculino de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Pillidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 7, n. 1-2, p. 197-206, 1990.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; NOËL, T.; ROMESTAND, B.; BEAUVILLAIN, J. C.; SALZET, P.; ROCH, P. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. **J. Cell Sci.** v. 113, p. 2759- 2769, 2000.

MORENO-RUEDA, G. The colour white diminishes weight loss during aestivation in the arid-dwelling land snail *Sphincterochila (Albea) candidissima*. *Iberus*, 26 (1): 47-51. Rao VB, Satyamurti P, Brito JJB, 1986. On the 1983 drought in Northeast Brazil, **J. Climat.**, v. 6, p. 43-51, 2008.

NARANJO-GARCIA, E. Impacto de los moluscos en el ser humano. **Resumos do 1º Congresso Mexicano de Etnobiologia**, Toluca, México, p. 39, 1994.

NOMURA, H. **Usos e costumes dos animais**. Fundação Vingt- Um Rosado/ETFERN/UNED, Mossoró, Brasil, 1996, 82p.

PAUL, W. E. **Fundamental immunology**. Lippincott, Williams and Wilkins, 5 ed., Philadelphia, p. 1077-1103, 2003.

PAULINI, H. M.; PAULINI, E. Observações de laboratório sobre controle biológico de *Biomphalaria glabrata* pela *Pomacea* sp.(Ampullariidae). **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 23, p. 135-149, 1971.

PESSÔA, H. L.F. Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda). **Rev. Bras. de Farmacog.**, v. 17, n. 1, p. 76-84, 2007.

PIERI, O.; JURBERG, P. Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da esquistosomose ao tratamento com moluscidas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 47-55, 1981.

PINDER, A.W.; STOREY, K. B.; ULTSCH, G. R. **Aestivation and hibernation**. In: Feder, M.E., Burggren, W.W. (Eds.), *Environmental Biology of the Amphibia*. University of Chicago Press, Chicago, p. 250–274, 1992.

PINHEIRO, J. Influence of starvation on the glycogen and galactogen contents in the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Braz. Arch. Of Biol. And Technol.**, v. 39, n. 2, p. 349-357, 1996.

PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Dev. Comp. Immunol.** v. 16, p. 111-122, 1992.

RAUT, S. K.; GHOSE, K.C. Factors influencing gestation length in two land snails, *Achatina fulica* and *Macrochlamys indica*. **Malacol. Rev.**, v. 13, p. 33-36, 1980.

RAUT, S.K.; PANIGRAHI, A. Egg-nesting in the garden slug *Laevicaulis alte* (Férussac) (Gastropoda, Soleolifera). **Malacol. Review**, v. 21, p. 101-104, 1988.

RAUT, S.K., RAHMAN, M. S.; SAMANTA, S.K. Influence of temperature on survival, growth and fecundity of the freshwater snail *Indoplanorbis exustus* (Deshayes). **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 15-19, 1992.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. **Insect responses to parasites and other pathogens**. In: JOULSBY, E. J. L. (Ed.). *Immune responses in parasitic infection: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, protozoa, arthropods and invertebrate*. Florida: C. R. C. Press, p.123-254, 1987.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGEALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. Rev. Cytol.**, v. 97, p. 183-279, 1985.

RAWLINGS, T. A. et al. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snail s in the continental United States. **BMC, Evol. Biol.**, v. 7, n. 97, p. 1-14, 2007.

RIBEIRO, C.; SIMÕES, N.; BREHÉLIN, M.. Insect immunity: the haemocytes of armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role defence reactions *in vivo* and *in vitro* studies. **J. Insect Physiol.**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 815-822, 1996.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. **Invertebrados: manual de aulas práticas**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2002. 226p.

RICHARDOT, M. Ecological factors inducing estivation in the freshwater limpet *Ferissia waltieri* (Basomatophora: Ancyliidae).I. Oxygen content, organic matter content and pH of the water. **Malacol. Review**, Ann Arbor, v. 10, n. 1-2, p. 159-170, 1977.

ROJAS, J. M. et al. Variabilidad geografica em la tolerancia termica y economia hidrica Del gastropodo intermareal *Nodilittorina peruviana* (Gastropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822). **Rev. Chil. Hist. Nat.**, Santiago, v. 73, n.3, p. 543-552, 2000.

ROSSI, I. C.; SILVA, S. M. R. Effects of starvation and a carbohydraterich diet on glycogen metabolism in a gastropod mollusc, *Megalobulimus oblongus* Comparative Biochemistry and Physiology Part A: **Physiology**, v. 106, n. 4, p. 831-836, 1993.

ROWLEY, A. F.; BROOKMAN, J. L.; RATCLIFFE, N. A. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. **J. Invert. Pathol.**, v. 56, p. 31-38, 1990.

RUPPERT, E.E.; FOX, R. S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7 ed. São Paulo: Editora Roca, 2005, 1168p.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **J. Invert. Pathol.** v. 47, p. 167-172, 2001.

RUSSO, J., LAGADIC, L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). **Environ. Pollut.** v. 127, p. 303-311, 2004.

SANTOS, E. **Os Moluscos (Vida e Costumes)**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1982.

SIEFKER, C. C., CARTHER, J. N.; BLANKESPOOR, H. D. Tolerance of *Biomphalaria glabrata* to continuous thermal stress. **Malacol. Rev.** v. 11, p. 1-25, 1977.

SILVA, C.; GARY, B. D.; RAU, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 24, p. 367-379, 2000.

SILVA, C. C. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 68-72, 2002.

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W. P. W. Cells and molecules in molluscan immunology. **Dev. Comp. Immunol.** v. 11, p. 17-28, 1987.

SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanism of arthropods: a review. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 6, p. 601-611, 1982.

STORER, T. I et al. **Zoologia geral**. 6 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2003, 850p.

STOREY, K.B. Life in slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, v. 133, p. 733-754, 2002.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation. **Res. Rep. Biol.** v. 2, p. 57-68, 2011.

STOREY, K.B; STOREY, J.M. Aestivation: signalling and hypometabolism. **J. Exp. Biol.** v. 215, p. 1425-1433, 2012.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Rev. Entomol.**, v. 40, p. 31-56, 1995.

STUART, L. M, EZEKOWITZ, R. A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. **Nat. Rev. Immunol.** v. 8, n. 2, p. 131-141, 2008.

TISCAR, P. G.; MOSCA, F. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. **Vet. Res. Comm.** v. 28 (Suppl. 1), p. 57-62, 2004.

THIENGO, S. C. Observations on the morphology of *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Ampullariidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 563-570, 1987.

THIENGO, S. Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824). In: BARBOSA, FS (org.) **Tóp. Malacol. Méd.**, Editora Fiocruz, p. 50-69, 1995.

TRIVERS, M. A. et al. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. **Fish Shellfish Immunol.** v. 24, p. 400–411, 2008.

VAN DER KNAAP, W. P.; LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode snail interactions. **Parasitol. Today**, v. 6, p. 175–182, 1990.

VAN DER SCHALIE, H.; BERRY, E.G. The effects of temperature on growth and reproduction in aquatic snails. **Malacol. Rev.**, v. 6, n. 12, p. 60, 1973.

VASTA, G. R.; AHMED, H. **Animal lectins: A functional view**. CRC Press, Boca Raton FL, p. 475-491, 2009.

VIEIRA, T. C.; COSTA-FILHO, A.; SALGADO, N. C. Acharan sulfate, the new glycosaminoglycan from *Achatina fulica* Bowdich 1822. Structural heterogeneity,

metabolic labeling and localization in the body, mucus and the organic shell matrix. **Eur J Biochem**, v. 271, p. 845-854, 2004.

WIKTOR, A. Spermatophores in Millacidae and their significance classification (Gastropoda, Pulmonata). **Malacol. Abhandlungen**, Dresden, v. 12, n. 9, p. 1-100, 1987.

WILLIAMS, E.E. Seasonal variations in the biochemical composition of the edible winkle *Littorina littorea*. **Compar. Biochem. Phys.** v.33, p. 655-661, 1970.

WILLIAMS, D. D. **The biology of temporary waters**. Oxford Univ. Press. Oxford, U. K. 337p, 2006.

## Capítulo II

### Aspectos imunológicos do caramujo *Pomacea lineata* (Spix 1827) sob condições de estivação induzida

Bárbara Brooklyn Timóteo Nascimento Silva<sup>1</sup>, Gyl Everson de Souza Maciel<sup>2</sup>,

Franklin Magliano da Cunha<sup>1</sup>, Valéria Wanderley Teixeira<sup>1</sup>,

Álvaro Águiar Coelho Teixeira<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup> *Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Brasil*

<sup>2</sup> *Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Recife, Brasil*

\*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

*E-mail:* alvaro@dmfa.ufrpe.br

#### Resumo

A estivação é um estado de torpor aeróbico que provavelmente é uma estratégia de sobrevivência para suportar o estresse ambiental, incluindo a aridez do solo, o calor, ou a escassez de alimentos. Quando em estivação os moluscos apresentam redução das reservas de carboidratos, passando a utilizar outros substratos, como as proteínas, para a obtenção de energia, já que é necessário manter o metabolismo basal. Assim, este trabalho teve o objetivo de investigar possíveis alterações no número total de hemócitos, níveis de óxido nítrico, atividade da fenoloxidase e também verificar a reserva energética com a dosagem do teor de proteínas totais, na hemolinfa do caramujo *Pomacea lineata* em condições de estivação

induzida, visando uma melhor compreensão da atividade do sistema imune para sua sobrevivência. Os caramujos foram divididos em dois grupos: controle e estivação. Para induzi-los à estivação procedeu-se a retirada gradual de água no aquário e abstenção de alimento, permanecendo nestas condições por 60 dias. Alíquotas de hemolinfa de 40 indivíduos foram coletadas para as análises dos dois grupos experimentais. Os resultados revelaram que a estivação reduziu os níveis de proteínas totais em cerca de 56,8% e a atividade da enzima fenoloxidase em função do tempo, na hemolinfa, contudo o seu sistema imunitário foi suprido pela elevação de aproximadamente 45,2% do número de hemócitos e níveis de óxido nítrico em 21,2%, o que pode conferir maior chance de sobrevivência, e que a atividade da fenoloxidase parece ser dependente da nutrição.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pomacea lineata*, estivação, hemócitos, óxido nítrico, fenoloxidase, proteínas totais.

## **1. Introdução**

O caramujo *Pomacea lineata* (Spix 1827) é um gastrópode pertencente à família Ampullaridae cuja distribuição geográfica inclui quase toda a Região Neotropical, na qual habita águas de curso lento e estagnadas geralmente habitando águas de curso lento e estagnadas (Thiengo 1995; Ruppert; Fox; Barnes 2005). Esse caramujo no nordeste do Brasil tem uma posição chave na cadeia alimentar porque serve de alimento para muitos animais, e pode ser um recurso valioso para monitoramento da qualidade da água dessa região (Fellerhoff 2002; Coler et al., 2005). Além disso, algumas espécies do gênero *Pomacea* apresentam grande potencial no controle biológico dos hospedeiros intermediários do



*Schistosoma mansni* (Sambon, 1907), os caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), e *B. straminea* (Dunker, 1848) (Guimarães 1981).

A duração da estação seca pode variar de ano para ano e de região para região, com o máximo de 90 dias de chuva durante o ano todo em determinados locais do nordeste brasileiro (Silva et al., 2011). Durante a época de estiagem *P. lineata* se enterra no solo e sobrevive graças a sua capacidade de estivação (Lum-Kong; Kenny 1989; Kenneth 2001). A estivação é um estado de torpor, sendo uma estratégia de sobrevivência para suportar o estresse ambiental, incluindo a aridez do solo, a elevação da temperatura, ou a escassez de água e de alimentos, ou os três fatores que estão, via de regra, associados. Entretanto, a literatura relata que muitos desses fatores ambientais estressantes reduzem a atividade imunológica no molusco marinho *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Lacoste et al., 2001; Gagnaire et al., 2006).

O sistema imunológico dos moluscos envolve tanto respostas humorais, incluindo produção de “espécies reativas de oxigênio” (ROS) e óxido nítrico (NO) (Pipe 1992), atividade da enzima fenoloxidase e secreção de proteínas antimicrobianas (Mitta et al., 2000), como também as reações imunes celulares, realizadas pelos hemócitos, que executam, dentre outras funções, o encapsulamento e fagocitose do patógeno (Sminia; Van Der Knaap 1987).

A resposta imune nos invertebrados tem sido investigada em estudos ecológicos e ecotoxicológicos, em parte devido a sua relevância para a saúde e a sobrevivência dos indivíduos frente a diversos patógenos (Das; Khangarot 2010, 2011). Nos gastrópodes a sobrevivência depende da capacidade de superar a ação imediata do patógeno com a produção de ROS e NO produzidos pelos hemócitos para montar respostas distintas para diferentes categorias de patógenos, e poder estabelecer respostas secundárias eficazes como a melanização, encapsulação e fagocitose (Roger et al., 2008a, 2008b).

Muitos aspectos da resposta imunológica dos gastrópodes são ainda pouco conhecidos, principalmente durante a estivação, em parte devido à maioria dos estudos se concentrarem em um segmento muito pequeno (importância econômica na saúde pública) da diversidade gastrópode, e em condições ambientais normais (Rosa et al., 2006; Negrão-Correa et al., 2007; Adema et al., 2010). Assim, este trabalho teve o objetivo de investigar possíveis alterações no número de hemócitos, níveis de óxido nítrico, atividade da fenoloxidase e teor de proteínas totais no caramujo *P. lineata* em condições de estivação induzida, visando uma melhor compreensão da atividade do sistema imune para sua sobrevivência.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Caramujos*

*P. lineata* foram coletados, por conveniência, nos tanques da Estação de Aquicultura Continental Johei Koike da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Após a coleta foram levados ao Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, onde foram mantidos em aquários de vidro (devidamente cobertos com uma tela para evitar a fuga dos animais e o contato com possíveis vetores) de dimensões 40x25x60 cm com capacidade para 60 litros de água, mas com metade da quantidade de água suportada, temperatura ambiente de  $26^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ , com alimentação *ad libitum* com folhas frescas de alface (*Lactuca sativa*) previamente higienizadas numa proporção de uma folha para cada oito indivíduos.

Em cada aquário eram colocados 20 animais. Em dias alternados havia a troca total da água dos aquários. Estes animais foram mantidos nestas condições por sessenta dias para adaptação as condições de laboratório, e após este período, foram medidos de uma

extremidade a outra da concha, com auxílio de um paquímetro, e os caramujos que apresentavam de 2,5 a 3,0 cm de tamanho e peso de aproximadamente  $4,71 \pm 1,73$  gramas, foram divididos em dois grupos: controle e estivação, cada um com 60 indivíduos.

O grupo controle foi mantido em aquários com cerca de 30 litros de água. Diariamente foi observada a sobrevivência, e os animais mortos eram retirados imediatamente do aquário, nos dois grupos. O animal era dado como morto quando o opérculo desprendia-se da abertura da concha, ou quando a concha era encontrada “vazia” no aquário. Houve uma mortandade de cerca de 20% dos animais do grupo controle.

## *2.2 Indução à estivação*

No grupo estivação, a cada dois dias, cinco litros de água eram retirados do aquário, além da redução gradual da quantidade de folhas de alface oferecidas. Após o período de aproximadamente 16 dias a água foi totalmente retirada e procedeu-se também a abstenção de alimento. Também foi observada a sobrevivência diariamente, e os animais mortos eram retirados imediatamente do aquário. A mortandade no grupo estivação foi superior, cerca de 20% a mais que no grupo controle. A estivação teve duração de sessenta dias.

## *2.3 Coleta de hemolinfa*

Um total de 40 caramujos (independente do sexo) por grupo foi utilizado para a coleta da hemolinfa. Cada caramujo era higienizado com água destilada, em seguida foram envolvidos em papel absorvente para secagem. Uma pequena ruptura foi realizada na parte posterior a espiralação da concha para coleta de hemolinfa da cavidade pericárdica. Um pedaço de papel filtro triangular era colocado nesta abertura para absorção da água ainda

existente dentro da concha afim de que não ocorresse a contaminação da amostra. Utilizando uma agulha de insulina um pequeno corte era dado na cavidade pericárdica e com ajuda de uma micropipeta de ponteiros previamente siliconizadas, a hemolinfa foi coletada nas proporções para cada análise.

## *2.4 Análises da hemolinfa*

### *2.4.1 Imunidade celular*

#### *2.4.1.1 Contagem total de hemócitos*

Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de hemolinfa por indivíduo ( $n=10$ ) por grupo foi adicionada a 20  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de sódio, e colocados em eppendorf de 1 mL. Após a mistura, as amostras foram levadas a câmara de Neubauer e o número de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado.

### *2.4.2 Imunidade humoral*

#### *2.4.2.1 Dosagem de óxido nítrico*

Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de hemolinfa/caramujo ( $n=10$ ) por grupo, foram adicionadas a 70  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida e mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua análise. A produção de óxido nítrico foi determinada usando o reagente de Griess (Green et al., 1981), com leitura da absorbância realizada em leitora de microplacas (ELx800 - Biotek<sup>®</sup>) com filtro 562nm e do programa Gen5 Elisa (Biotek<sup>®</sup>).

#### *2.4.2.2 Atividade da Fenoloxidase*

Amostras de 100µL de hemolinfa/caramujo (n=10) por grupo foram diluídas em 200µL de tampão fosfato de sódio a 0,1M e mantidas em freezer a -20°C até sua utilização. Triplicadas de 50µL da mistura hemolinfa/tampão foram transferidas para microplacas de 96 poços. A ativação da fenoloxidase foi realizada pelo uso de 50µL L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4g/L (Sigma-Aldrich, St. MO, USA). A absorbância foi obtida em leitora de microplacas (ELx800 - Biotek®) com filtro 492nm em intervalos de dois minutos, durante 2h. A atividade da fenoloxidase foi obtida durante a fase linear da reação nos 20 minutos iniciais de avaliação (Faraldo et al., 2006).

#### *2.4.2.3 Proteínas totais na hemolinfa*

A concentração de proteínas totais foi obtida em triplicada através do teste de Bradford (1976). Alíquotas de 50µL de hemolinfa/caramujo (n=10) por grupo foram diluídas em 200µL de tampão fosfato de sódio a 0,1M e transferidas para microplacas de 96 poços, adicionando-se em cada poço 100µL de reagente de Bradford. Absorbância foi medida em 595nm com leitora de microplacas (ELx800 - Biotek®) após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente. A curva padrão de proteína foi determinada utilizando soro albumina bovina (BSA).

#### *2.5 Análise estatística*

Os dados obtidos em todas as análises foram submetidos ao t-teste 5% ( $p < 0,05$ ) de probabilidade.

### 3. Resultados

#### 3.1 Peso dos caramujos

Após pesagem dos animais em balança analítica, foi observada uma diminuição significativa da massa corpórea de *P. lineata* estivante ( $3,29\text{g} \pm 0,85$ ) em relação aos do grupo controle ( $4,71\text{g} \pm 1,73$ ) ( $t_{18} = 1,73$ ,  $p = 0,0107$ ).

#### 3.2 Resposta imune celular

##### 3.2.1 Contagem total de hemócitos

A análise estatística mostrou um aumento de aproximadamente 45,2% do total de hemócitos em *P. lineata* estivantes ( $6,1 \pm 0,43 \times 10^3$  hemócitos por  $\mu\text{L}$  de hemolinfa) em relação ao grupo controle ( $4,2 \pm 0,43 \times 10^3$  hemócitos por  $\mu\text{L}$  de hemolinfa), diferindo significativamente entre si ( $t_{18} = -3,02$ ,  $p = 0,0073$ ) (Fig. 1).

#### 3.3 Resposta imune humoral

##### 3.3.1 Dosagem de óxido nítrico

A hemolinfa dos caramujos apresentou uma produção média de óxido nítrico de  $16,56 \pm 0,014$  e  $20,07 \pm 0,012$  para os grupos controle e estivante, respectivamente (Fig. 2). Foi observada diferença significativa entre os tratamentos ( $t_{18} = -0,32$ ,  $p = 0,0017$ ), com o aumento de cerca de 21,2% da produção deste composto no grupo estivante (Fig. 2).

##### 3.3.2 Atividade de fenoloxidase

Os caramujos de *P. lineata* do grupo estivante apresentaram uma atividade da enzima fenoloxidase significativamente menor em relação aos caramujos do grupo controle em função do tempo (Fig.3).

### 3.3.3 Proteína total na hemolinfa

Em relação à dosagem de proteína total na hemolinfa de *P. lineata* também houve uma redução significativa de cerca de 56,8% comparando os grupos estudados ( $t_{18}=2,24$ ,  $p=0,038$ ). Uma média de  $100,12 \pm 0,16$   $\mu\text{g/mL}$  para o grupo controle, e  $56,92 \pm 0,11$   $\mu\text{g/mL}$  para o grupo estivante (Fig. 4).

## 4. Discussão

Assim como outros invertebrados, os moluscos são desprovidos de um sistema adaptativo com produção de moléculas de reconhecimento altamente específicas (anticorpos e receptores) e células de memória como ocorre nos vertebrados. Contudo, seu sistema imune possui uma resposta de defesa bastante eficiente que pode garantir o sucesso no combate a agentes infecciosos. Nos gastrópodes, a resposta imunológica está associada a parâmetros de defesa celular e humoral. Esta atuação de forma integrada é necessária para proteger os moluscos contra infecções e garantir sua homeostase (Vargas-Albores; Barracco, 2001; Barracco; Da Silva, 2008). Entretanto a produção de muco pelo corpo do animal também coopera como uma barreira física inicial à colonização de patógenos (Vieira et al., 2004).

Em situações patológicas, como durante infecções e/ou estresses de origem ambiental, o número e o tipo de hemócitos podem ser alterados nos gastrópodes (Simões, 2011). Essas

alterações puderam ser observadas no número de hemócitos circulantes na hemolinfa de *P. lineata* estivantes, caracterizada por um aumento significativo em relação aos animais do grupo controle. Segundo Le Moullac; Haffner (2000) e Perazzolo et al. (2002) valores baixos na contagem total de hemócitos resultam em uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas, e períodos prolongados nessa situação levam a uma depleção do sistema imune, o que aumenta o risco de infecções tanto por microrganismos patogênicos como por microrganismos oportunistas. Ao contrário, uma maior quantidade de hemócitos presentes na circulação confere uma maior resistência a patógenos (Le Moullac et al., 1998). Portanto, para um bom funcionamento dos fatores celulares de defesa é importante não só a quantidade de hemócitos presentes na circulação, mas também a intensidade de resposta ao primeiro estímulo, resultando em uma proliferação adequada para a manutenção de níveis ideais do número de hemócitos e grau de ativação das células (Maldonado et al., 2003).

Além dos hemócitos circulantes, componentes solúveis da hemolinfa também são importantes na defesa dos moluscos contra parasitos (Van Der Knaap; Loker, 1990). Esses componentes podem agir diretamente sobre os organismos invasores, por meio de moléculas tóxicas e peptídeos líticos; ou, indiretamente, por meio de mediadores do reconhecimento de patógenos ou ativadores de hemócitos, como lectinas, lisozima e produtos da ativação do sistema profenoloxidase (Cheng; Chorney; Yoshino, 1977; Glinski; Jarosz, 1997; Adema et al., 1997; Negrão-Corrêa et al., 2007).

A atividade da fenoloxidase foi significativamente menor na hemolinfa dos animais mantidos em estivação. Apesar de ter uma diferença no tempo de jejum dos animais expostos a estivação, Mattos (2011) obteve achados semelhantes ao nosso. Esse autor padronizou um período de coleta de hemolinfa pós-alimentação nos gastrópodes *B. tenagophila* (linhagens Taim e Cabo Frio) transmissores da esquistossomose, expostos ao *S. mansoni* ou *Echinostoma paraensei* (Rudolphi, 1809), avaliando a atividade do sistema da fenoloxidase. Observou uma



atividade da enzima maior nos animais com menos tempo de jejum, neste caso com apenas 1 dia de jejum, e a medida que o tempo de jejum aumentava (chegando a dez dias) a enzima ficava menos ativa. Este fato também foi verificado por Garcia et al. (2004) com o barbeiro *Rhodinus prolixus* (Stal, 1859) infectado com *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), onde quanto maior o tempo pós-alimentação dos barbeiros, menor era a atividade da enzima fenoloxidase. Isto sugere que embora essa enzima participe da defesa humoral nos invertebrados, parece ser afetada pela restrição alimentar e não pelas alterações dos fatores abióticos durante a estivação, indicando ainda que talvez não seja primordial no processo imunológico em *P. lineata*.

Um dos pilares conceituais da imunidade dos gastrópodes é que os hemócitos interagem em conjunto com várias categorias diferentes de fatores moleculares de defesa, muitos deles circulam na hemolinfa, juntos de forma mais eficaz no reconhecimento e desativação de patógenos. Esses fatores, por sua vez, são sintetizados e liberados pelos hemócitos (Martin; Oakes; Tousignant, 2007), incluindo as espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico (NO) e os peptídeos antimicrobianos (AMPs).

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual (Flora Filho; Zilberstein, 2000). Antagônico porque é um importante mensageiro intercelular e também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. A sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida.

Com o papel de defesa em um organismo, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microorganismos invasores. Já foi demonstrado por

Lowenstein et al. (1993) e Drapier et al. (1988) que o NO tem ação antibactericida, antiparasítica e antiviral. Como em nosso experimento *P. lineata* não estava exposto a patógenos, o aumento do NO possivelmente ocorreu devido ao estresse ambiental o qual o animal foi exposto, do mesmo modo que aconteceu com o número de hemócitos. Pois, nesta condição há o acúmulo de ácidos orgânicos e produtos nitrogenados (NO), oriundos da elevada degradação de carboidratos, por meio do metabolismo aeróbico e da degradação de proteínas (Moreira et al., 2003). No entanto o NO é potencialmente tóxico, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (Dusse; Vieira, 2003). Assim é importante ressaltar que o intenso catabolismo das proteínas leva ao aumento na produção de compostos nitrogenados nos caramujos, porém durante a estivação há a conversão em ácido úrico, um produto menos tóxico (Becker 1993), isso poderia equilibrar a produção de NO evitando sua toxicidade.

Em contrapartida, a dosagem de proteínas totais nos caramujos estivantes foi baixa quando comparados aos animais em condições normais. A estivação expõe o animal a um estado bastante vulnerável, do ponto de vista metabólico e físico. Durante a estivação, os animais reservam o máximo de energia possível, acumulando proteínas e carboidratos para suportar o período de estiagem e de inanição, contudo, segundo Storey (2002) estas reservas são utilizadas para manter o metabolismo basal do caramujo, garantindo assim sua sobrevivência. Provavelmente foi o que ocorreu neste estudo, pois os níveis de proteínas totais diminuíram quando iniciada a estivação. Outro ponto também constatado foi a diminuição da massa corpórea, uma média de  $4,71g \pm 1,73$  para  $3,29g \pm 0,85$  dos animais estivantes. Assim, confirma que durante a estivação não há ganho de peso, pois não há energia disponível para o crescimento (Moreno-Rueda, 2008).

Lira et al. (2000) observaram que no período de 30 dias em estivação a concentração de proteínas no organismo de *B. similis*, mostrou uma tendência a decrescer, atingindo

valores 70% abaixo do normal, indicando que o molusco estava metabolizando proteínas. Apesar do período de estivação ser menor que o do nosso estudo (60 dias), este trabalho confirma os nossos achados, pois a dosagem de proteínas totais na hemolinfa do *P. lineata* resultou em  $100,12 \pm 0,16$  µg/mL para o grupo controle reduzindo para  $56,92 \pm 0,11$  µg/mL no grupo dos estivantes, aproximadamente 57% abaixo do normal. Yusa et al. (2006) também observou a redução do peso corpóreo de outra espécie de Pomacea, *P. canaliculata* em períodos de estivação bem superiores chegando até 29 meses.

## 5. Conclusão

Embora *P. lineata* apresente redução da atividade da enzima fenoloxidase, na hemolinfa, quando induzidos a estivação, o seu sistema imunitário é compensado pela elevação do número de hemócitos e níveis de óxido nítrico, o que pode conferir maior chance de sobrevivência. A atividade da fenoloxidase parece ser dependente da nutrição, visto que houve também a redução dos níveis de proteínas totais nos caramujos estivantes, o que pode influenciar na defesa imunológica. Durante a estivação houve a metabolização de proteínas para manter o metabolismo do animal, que por sua vez não ganhou peso. Assim, estudos complementares sobre esse aspecto devem ser desenvolvidos para auxiliar a compreensão do sistema imune desses caramujos.

## 6. Referências

Adema, C. M.; Hertel, L. A.; Miller, R. D.; Loker, E. S., 1997. A family of fibrinogen – related proteins that precipitates parasite – derived molecules is produced by na invertebrate after infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, n. 16: 8691-8696.

Adema, C. M. et al., 2010. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes), 47, n. 4: 849-860.

Barracco, M. A.; Da Silva, P. M., 2008. Hemolinfa e Sistema Imune. In: Mexilhão *Perna perna* (L.): biologia, ecologia e aplicações. Resgalla J. R.; Weber, L. I.; DA CONCEIÇÃO, M. B. (eds.) Rio de Janeiro: Interciência: 85-102.

Becker, B. F, 1993. Towards the physiological function of uric acid. Free Radic. Biology and Medicine. 14: 615–631.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

Cheng, T. C.; Chorney, M. J.; Yoshino, T. P., 1977 Lysozymelike activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. J Invertebr Pathol, 29, n. 2: 170-74.

- Coler, R.A.; Coler, R. R.; Felizardo, E. G.; Watanabe, T., 2005. Applying weight gain in *Pomacea lineata* (Spix 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a measure of herbicide toxicity. *Brazilian Journal of Biology*, 65: 617-623.
- Das, S.; Khangarot, B. S., 2010. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater*, 179: 665-675.
- Das, S.; Khangarot, B. S., 2011. Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater*, 185: 295-305.
- Drapier, J. C.; Weizesbin, J.; Hibbs, J. B., 1988. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. *European J. Immuno*, 18: 1587-1592.
- Dusse, L. M. S.; Vieira, L. M., 2003. Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 39, n.4: 343-350.
- Faraldo, A.C.; Nóbile, P.M.; Daffre, S.; Gregório, E.A.; Lello, E. 2006. Prophenoloxidase activation in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Anais do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular*, p. 136.
- Flora Filho, R.; Zilberstein, B., 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.* [online], 46, n. 3: 265-271.
- Fellerhoff, C., 2002. Feeding and Growth of Apple Snail *Pomacea lineata* in the Pantanal Wetland, Brazil—a Stable Isotope Approach. *Isot. Envir. Health Studies*, 38, n. 4: 227-243.
- Gagnaire, B.; Frouin, H.; Moreau, K.; Thomas-Guyon, H.; Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol*, 20, n. 4: 536-547.
- Guimarães, C. T., 1981. Algumas observações de laboratório sobre a biologia e ecologia de *Pomacea haustorium* (Reeve, 1856). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76: 33–46.
- Garcia, E. S.; Machado, E. M.; Azambuja, P., 2004. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect Physiol.*, 50, n. 2-3: 157-65.
- Glinski, Z.; Jarosz, J., 1997. Molluscan immune defenses. *Arch Immunol Ther Exp*, 45, n. 2-3: 149-55, 1997.
- Green, L. C.; De Luzuriaga, K. R.; WagneR, D. A.; Rand, W.; Istfan, N.; Young, V. R.; Tannenbaum, S. R., 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 7764–7768.
- Kenneth, B. S., 2001. Turning down the fires of life: Metabolic regulation of Hibernation and aestivation Bios Scientific publishers, Oxford: 1-21.

- Lacoste, A.; Jalabert, F.; Malham, S. K.; Cueff, A.; Poulet, S. A., 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol.*, 67, n. 5: 2304-2309.
- Le Moullac, G.; Soyeux, C.; Saulnier, D.; Ansquer, D.; Avarre, J.C.; Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 621-629.
- Le Moullac, G.; Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture*, 191: 121-131.
- Lira, C. R. S.; Gomes, E. M.; Chagas, G. M.; Pinheiro, R., 2000. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac) (Mollusca, Gastropoda, Xanthonychidae). *Rev. Bras. de Zool.*, 17, n. 4: 907-913.
- Lowenstein, C.; Allen, G.; Walker, A.; Rose, N.; Snyder, S.; Herskowitz, A., 1993. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. *Circulation*, 88: IG-IH (Abstr).
- Lum-Kong, A.; Kenny, J. S., 1989. The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). *J Mollus Stud*, 55: 53-65.
- Maldonado, M.; Rodríguez, J.; Blas, I.; Echeverría, F., 2003. Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. In: CIVA 2003, Zaragoza, 01/set./2003. *Anais do Congresso Iberoamericano Virtual de Aquicultura*, Zaragoza: 891-899.
- Martin, G. G.; Oakes, C. T.; Tousignant, H. R., 2007. Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *J Mollus Stud*, 73: 355-365.
- Mattos, A. C.; Martins-Souza, R. L.; Kusel, J. R.; Coelho, P. M., 2011. Interaction between primary and secondary sporocysts of *Schistosoma mansoni* and the internal defence system of *Biomphalaria* resistant and susceptible to the parasite. Intermediate hosts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106: 424-432.
- Mitta, G.; Vandenbulcke, F.; Noël, T.; Romestand, B.; Beauvillain, J. C.; Salzet, M.; Roch, P., 2000. Differential distribution and defense involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.*, 113: 2759-2769.
- Moreira, C. S. D. R.; Gomes, E. M.; Chagas, G. M.; Pinheiro, J., 2003. Calcium changes in *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) under starvation. *Rev. Bras. de Zool.*, 5, n. 1: 45-54.
- Moreno-Rueda, G., 2008. The colour white diminishes weight loss during aestivation in the arid-dwelling land snail *Sphincterochila (Albea) candidissima*. *Iberus*, 26, n. 1: 47-51.
- Negrão-Corrêa, D.; Pereira, C. A. J.; Rosa, F. M.; Martins-Souza, R. L.; Andrade, Z. A.; Coelho, P. M. Z., 2007. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. *Invert Survival J*, 4: 101-111.

Perazzolo, L. M.; Gargioni, R.; Ogliari, P.; Barracco, M. A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214: 19-33.

Pipe, R. K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 111-122.

Roger, E.; Mitta, G.; Moné, Y.; Bouchut, A.; Rognon, A.; Grunau, C.; Boissier, J.; Théron, A.; Gourbal, B. E., 2008a. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Mol Biochem Parasitol.*, 157, n. 2: 205-216.

Roger, E.; Grunau, C.; Pierce, R. J.; Hirai, H.; Gourbal, B.; Galinier, R.; Emans, R.; Cesari, I. M.; Cosseau, C.; Mitta, G., 2008b. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl Trop Dis*, 2: 330.

Rosa, F. M.; Godard, A. L. B.; Negrao-Correa, D.; Rodrigues, H. A.; Carvalho, O. S.; Caldeira, R. L.; Teles, H. M. S.; Maciel, E.; Jannotti-Passos, L. K.; Coelho, P. M. Z., 2006. *Biomphalaria tenagophila*: dynamics of populations of resistant and susceptible strains to *Schistosoma mansoni*, with or without pressure of the parasite. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101: 247-251.

Ruppert, E. E.; Fox, R. S.; Barnes, R.D., 2005. *Zoologia dos Invertebrados*. 7 ed. São Paulo: Editora Roca, 1168p.

Silva, V. P. R., et al, 2011. Análise da pluviometria e dias chuvosos na região Nordeste do Brasil. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, 15, n. 2: 131–138.

Simões, E., 2011 Impacto da floração da alga nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna perna* cultivados em Santa Catarina. Dissertação de mestrado (Aqüicultura). Florianópolis.

Sminia, T.; Van Der Knaap, W. P. W., 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 17-28.

Storey, K. B., 2002. Life in slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 133: 733-754.

Thiengo, S., 1995. Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824). In: BARBOSA, FS (org.) *Tópicos em malacologia médica*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz: 50-69.

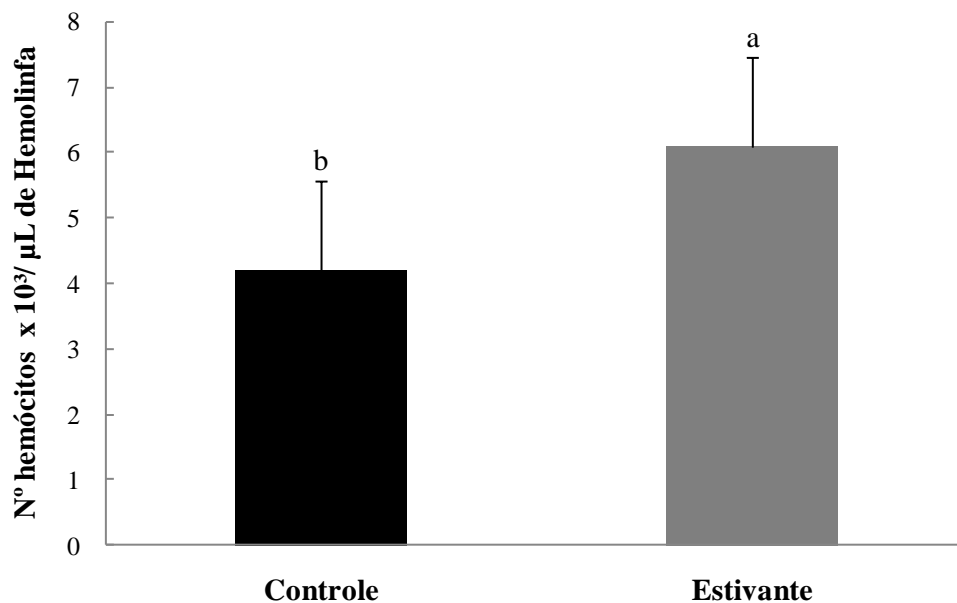
Van Der Knaap, W. P. W.; Loker, E. S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol Today*, 6: 175-82.

Vargas-Albores, F.; Barracco, M. A., 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ A. N. (ed.) *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. La Paz: Limusa, 127-140.

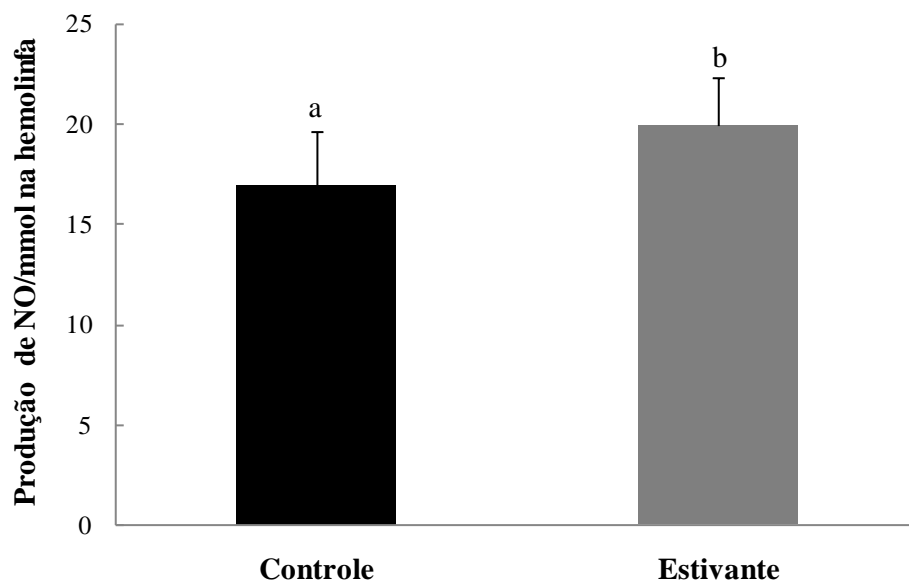
Vieira, T. C.; Costa-filho, A.; Salgado, N. C., 2004. Acharan sulfate, the new glycosaminoglycan from *Achatina fulica* Bowdich 1822. Structural heterogeneity, metabolic labeling and localization in the body, mucus and the organic shell matrix. *Eur J Biochem*, v. 271, p. 845-854.

Yusa, Y; Wada, T.; Takahashi, S., 2006. Effects of dormant duration, body size, self-burial and water condition on the long-term survival on the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampulariidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 41, n. 4: 627-632.

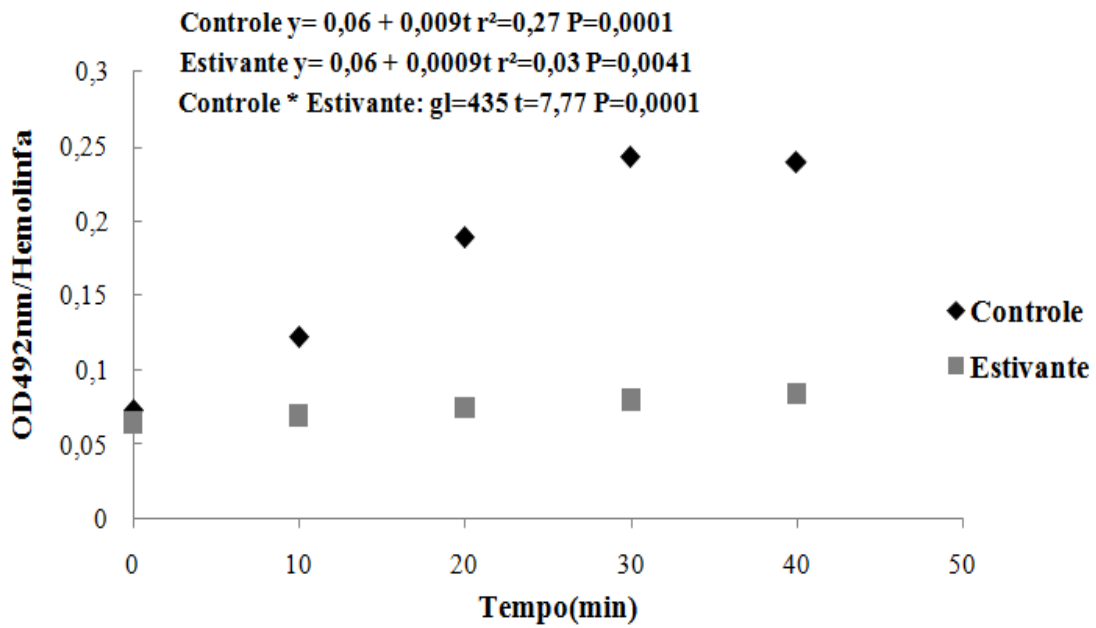




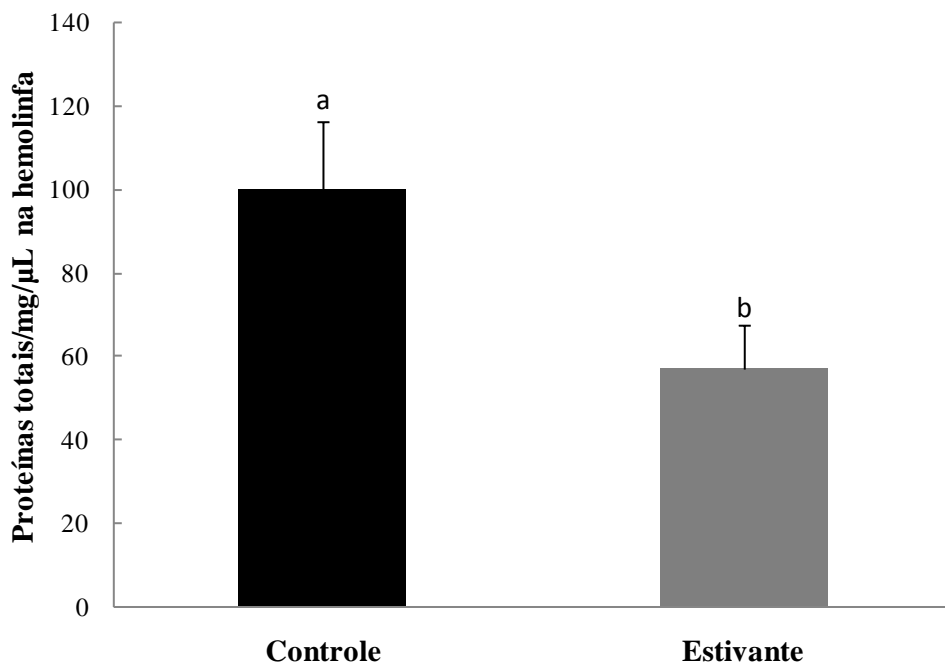
**Figura 1.** Contagem total (média ± D.P.) de hemócitos em caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação (n=10 caramujos/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo t-teste ( $\alpha = 0,05$ , n = 10 caramujos/tratamento).



**Figura 2.** Dosagem de óxido nítrico (NO) na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação (n= 10 caramujos/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo t-teste ( $\alpha = 0,05$ , n = 10 caramujos/tratamento).



**Figura 3.** Atividade da fenoloxidase [medida de densidade óptica (DO) a 490 nm] na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação como função do tempo (n= 10 caramujos/tratamento).



**Figura 4.** Médias das dosagens de proteínas totais na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* dos grupos controle e estivação (n= 10 caramujos/tratamento). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo *t*-teste ( $\alpha = 0,05$ , n = 10 caramujos/tratamento).