



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

GYL EVERSON DE SOUZA MACIEL

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E ÁCIDO ÚRICO NA
HEMOLINFA DE *Pomacea lineata* (SPIX, 1827) EM ESTIVAÇÃO INDUZIDA
E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A HISTOLOGIA GONADAL.**

RECIFE

2013

GYL EVERSON DE SOUZA MACIEL

**“ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E ÁCIDO ÚRICO NA
HEMOLINFA DE *Pomacea lineata* (SPIX, 1827) EM ESTIVAÇÃO INDUZIDA
E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A HISTOLOGIA GONADAL”**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em 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^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Prof^a. Dr^a. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira

RECIFE

2013

GYL EVERSON DE SOUZA MACIEL

**“ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CARBOIDRATOS E ÁCIDO ÚRICO NA
HEMOLINFA DE *Pomacea lineata* (SPIX, 1827) EM ESTIVAÇÃO INDUZIDA
E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A HISTOLOGIA GONADAL”**

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

Aprovado em 26 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim- UFRPE

“Dedico este trabalho a minha saudosa Vó Mariinha, sem sua ajuda, carinho e alegria não seria quem sou”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela proteção e força nos momentos mais difíceis, como também agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a produção deste trabalho.

Fontes financiadoras

Capes- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

RESUMO

Pomacea lineata (Spix, 1827) durante a época de estiagem se enterra no solo e sobrevive graças a sua capacidade de estivação. Estudos têm mostrado que durante a estivação os níveis de carboidratos e ácido úrico, podem fornecer informações mais precisas sobre a atividade das gônadas em resposta ao estresse ambiental. Assim, testou-se a hipótese de que as variações nos níveis de carboidratos e ácido úrico, durante a estivação induzida, pode afetar a histologia gonadal e gametogênese em *P. lineata*. Os caramujos foram submetidos à estivação por três, cinco e 10 meses. Testículos e ovários foram coletados e processados para análises histológicas. Os resultados mostraram aumento significativo dos níveis de carboidratos e ácido úrico proporcionalmente ao período de estivação, além de alterações histológicas nas gônadas. Assim, concluímos que a metabolização de proteínas é proporcional ao período de estivação, para síntese de carboidratos e excreção de ácido úrico, garantindo assim, a integridade do aparelho reprodutor.

PALAVRAS-CHAVE: gastrópodes, gônadas, estivação, histologia, ácido úrico, carboidrato.

ABSTRACT

Pomacea lineata (Spix, 1827) during the dry season buries itself in the ground and survives thanks to its ability to aestivation. Studies have shown that during aestivation levels of carbohydrates and uric acid, may provide more accurate information about the activity of the gonads in response to environmental stress. Thus, we tested the hypothesis that variations in the levels of uric acid and carbohydrate during aestivation induced, can affect gonadal histology and gametogenesis in *P. lineata*. The snails underwent aestivation of three, five and 10 months. Testes and ovaries were collected and processed for histological analysis. The results showed significant increase in the levels of uric acid and carbohydrates in proportion to the period of aestivation, and histological changes in the gonads. Thus, we conclude that the metabolism of proteins is proportional to the period of aestivation for carbohydrate synthesis and excretion of uric acid, thereby ensuring the integrity of the reproductive tract.

KEYWORDS: gastropods, gonads, aestivation, histology, uric acid, carbohydrate.

SUMÁRIO

Capítulos		Pág.
1	1. INTRODUÇÃO.....	10
	2. Revisão de Literatura.....	12
	2.1. Gastrópodes	12
	2.2. <i>Pomacea lineata</i>	13
	2.3. Gônadas.....	14
	2.4. Estivação.....	15
	2.5. Carboidratos.....	17
	2.6. Ácido Úrico.....	18
	3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
2	Análise dos níveis de carboidratos e ácido úrico na hemolinfa de <i>Pomacea lineata</i> (Spix, 1827) em estivação e sua influência sobre a histologia gonadal e gametogênese ...	26
	RESUMO.....	29
	1. INTRODUÇÃO.....	30
	2. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
	3. RESULTADOS.....	33
	4. DISCUSSÃO.....	36
	5. REFERÊNCIAS.....	38
	6. ANEXOS.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Concentrações médias de ácido úrico	42
Figura 2: Concentrações médias de carboidratos totais.....	43
Figura 3: Testículo de <i>P. lineata</i> dos grupos controle (A e B) e estivantes (C e D).....	44
Figura 4: Ovário de <i>P. lineata</i> dos grupos controle (A e C) e estivantes (B e D).....	45

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os moluscos da espécie de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca: Caenogastropoda) apresentam distribuição setentrional e litorânea, sendo encontrados em habitat dulcícolas desde o Nordeste até o Sudeste do país (THIENGO, 1995). Esta espécie possui grande importância na cadeia alimentar, pois servem de alimento para peixes, anfíbios, répteis, entre outros animais, exerce um papel importante na “limpeza natural” do leito dos rios, além de atuarem como controladores biológicos naturais do *Biomphalaria glabrata* (Say 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Pirajá da Silva, 1904) (CIMERMAN & CIMERMAN, 2005).

O potencial invasor de alguns moluscos está associado às estratégias de defesa contra condições ambientais desfavoráveis, fato que dificulta o manejo e controle desses animais. Dentre esses mecanismos tem-se a estratégia reprodutiva, o hábito de se enterrar e a produção do epifragma para impedir a perda de água (RAUT & BARKER, 2002). Durante a época de estiagem, por exemplo, estes moluscos se enterram no solo e sobrevivem graças a sua capacidade de estivação (LUM-KONG & KENNY, 1989).

A estivação é um fenômeno muito pouco conhecido, em relação aos seus mecanismos fisiológicos, particularmente entre as espécies neotropicais. Alguns estudiosos denominam como “sono de verão”, 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).

Durante a estivação ocorre um longo prazo de jejum e torpor corporal, acompanhado de outras respostas adaptativas em relação ao metabolismo de excreção de nitrogênio exibido por estivantes diferem daqueles exibidos por não estivantes submetidos a jejum ou imobilização. O metabolismo de excreção de nitrogênio durante a estivação está relacionado às fases de

indução e manutenção. Para a fase de indução, incluiu a ureia como um sinal de início da estivação, permeabilidade da pele a amônia, mudanças na taxa de produção de amônia e síntese de ureia. Para a fase de manutenção, a ênfase é a síntese e degradação de proteínas, produção de amônia e síntese e acúmulo de ureia (IP & CHEW, 2010).

Diversas espécies de moluscos apresentam estratégias fisiológicas e comportamentais à estivação, tais como: a retração da massa cefalopodal para o interior da concha e o enterramento no solo, que garantem a sobrevivência e o sucesso reprodutivo durante períodos desfavoráveis, com altas temperaturas e baixa ou nenhuma umidade (ARAD, 1993; EMBERTON, 1994).

A estratégia do caramujo de estivar ao se enterrar permite que os animais permaneçam sob a terra por um longo período se protegendo de condições ambientais desfavoráveis. No entanto, devem-se considerar a importância das características físicas e químicas do solo, como compactação e capacidade de retenção de água. A resistência das espécies a fatores abióticos está relacionada com o estágio de desenvolvimento e a natureza do estímulo (PACHECO et al., 1998).

De acordo com a literatura, a umidade influencia aspectos do ciclo de vida dos moluscos, tais como a alimentação, o ritmo dos batimentos cardíacos, a locomoção, o crescimento, os níveis de carboidratos, de proteínas e de lipídeos, bem como a espermatogênese e a produção e incubação dos ovos (COOK, 2001; FURTADO; BESSA; CASTANON, 2002; D'ÁVILA & BESSA 2005).

Alguns trabalhos também têm abordado aspectos histológicos do sistema circulatório (JIMÉNEZ-TABATA; FINOL; MARTINEZ, 1985) e digestivo (BEZERRA; KEMPER; BECKER, 1999) de moluscos durante a estivação. No entanto não há relatos na literatura sobre aspectos histológicos das gônadas durante esse processo. Dessa forma, em virtude da grande importância ecológica e econômica de *P. lineata*, faz-se necessária a investigação dos aspectos relacionados à histologia reprodutiva desses animais durante a estivação. Assim, a presente pesquisa visa descrever a histologia das gônadas do caramujo *P. lineata* sob condições de estivação induzida, bem como analisar os níveis de excreção de ácido úrico e das reservas de carboidratos na hemolinfa durante o período de estivação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Gastrópodes*

Os moluscos constituem um dos filos de invertebrados com maior número de espécies, dentre os quais as classes Gastropoda e Bivalve são bem representadas nos bentos marinhos (DIAZ & PUYANA, 1994). Gastrópodes são caracterizados por possuírem pés na região ventral, movendo-se através do deslizamento sobre o substrato, a cavidade do manto e os órgãos contidos localizam-se anteriormente, pois estes possuem uma ou duas brânquias dentro da cavidade do manto e seu sifão inalante corresponde a uma extensão do manto (RUPPERT & BARNES, 1996).

Uma das famílias pertencentes a classe dos gastrópodes são os Ampularídeos (Ampullaridae) que são considerados como anfíbios, porque possuem tanto uma guelra bem desenvolvida e um pulmão, e muitas vezes eles realizam a respiração aquática e aérea simultaneamente (MCCLARY 1964; ANDREWS 1965; BERTHOLD 1991; SEUFFERT & MARTÍN, 2009). No entanto, a importância relativa dos dois tipos de respiração varia muito, o gênero *Pomacea* vem sendo um dos gêneros mais especializados na respiração de ar atmosférico (ANDREWS, 1965). O grau de dependência da respiração aérea não foi investigado em Ampularídeos, embora em *Pomacea urceus* (Muller, 1774) mantidos por cinco dias em aquários aerados tenha sido observado que todos os caracóis sobreviveram em bom estado aparente (BURKY & BURKY, 1977).

Pomacea canaliculata (Lamarck, 1822) rotineiramente entra em contato com a superfície da água usando seu sifão para ventilar o pulmão e o intervalo entre emissões do sifão diminuem drasticamente com a queda da temperatura (SEUFFERT & MARTÍN, 2009). A frequência da ventilação pulmonar em *Pomacea* também aumenta com a diminuição do oxigênio dissolvido (MCCLARY, 1964; BURKY & BURKY 1977).

No Brasil alguns problemas causados pelo aumento das populações do caramujo *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) conhecido como gigante africano começaram a ser notados há cerca de oito a onze anos. Entre equívocos e exageros, a divulgação de que os animais transmitiriam doenças capazes de

levar à morte fez com que o pânico, associado ao pouco conhecimento científico sobre a espécie, e o grande número destes animais encontrados em várias regiões determinasse a implementação de uma legislação com relação à introdução de espécies exóticas de moluscos no país (THIENGO, 2004).

2.2. *Pomacea lineata*

O caramujo *Pomacea lineata* (Spix 1827) é regionalmente conhecido por aruá (em tupi-guarani quer dizer o mesmo que caracol), e possui ampla distribuição geográfica (THIENGO, 1995). Pertence ao Filo Mollusca que juntamente com os artrópodes, constituem o maior grupo de invertebrados. Está inserido na classe Gastropoda, que possui aproximadamente 40.000 espécies viventes e 15.000 fósseis (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004). São encontrados em rios de água-doce e amplamente distribuídos pela América do Sul (GUIMARÃES, 1981).

No Brasil, as espécies de moluscos do gênero *Pomacea* apresentam distribuição setentrional e litorânea, sendo encontrados em habitat dulcícolas desde o Nordeste até o Sudeste do país (THIENGO, 1995). Porém, é válido destacar que no Estado da Paraíba os mesmos são encontrados também em corpos d'água permanentes (BATALLA, 1997; MELO, 2000). Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, as espécies do gênero *Pomacea* são utilizadas como fonte de alimento e tanto o molusco quanto a sua desova são empregados na cura de doenças do "peito", tais como tosse, asma e tuberculose (MESQUITA, 1982). Na Argentina, a desova é utilizada na cura de disenteria (SANTOS, 1982).

Os *Pomacea lineata* são animais herbívoros que se alimentam utilizando a rádula para raspar o alimento. Sua digestão é extracelular graças às enzimas digestivas presentes nas glândulas salivares, bolsas esofágicas e divertículos digestivos (RUPPERT & BARNES, 1996), pertencem à família Ampullariidae, também conhecida como os ampularídeos tropicais (MELO et al., 2000).

Essa espécie é muito comum nos mananciais fluviais do Centro Sul do Brasil e regiões do rio Amazonas, onde se encontram também outras espécies de *Pomacea* (PAIN, 1960). Barboza (2002) em seus estudos para a caracterização nutricional do aruá e o escargot *Achatina fulica* (Férussac, 1821)

observou valores nutricionais favoráveis com relação aos teores de proteína e baixos teores de lipídios. A carne dos moluscos escargot e aruá são tecnicamente e sensorialmente viáveis para o consumo (BARBOZA; COSTA; ROMANELLI, 2006).

Cirelli (1992) caracterizou nutricionalmente a carne do *P. lineata* relatando a presença de aminoácidos essenciais, e também de microelementos como o ferro, zinco e manganês, cujas concentrações superam as necessidades diárias para consumo, recomendadas para um homem adulto (mg/kg) de acordo com Food and Nutrition Board (1980). Ainda Segundo Pulini e Paulini (1971), o *P. lineata* parece ainda exercer um papel importante na “limpeza natural” do leito dos rios e outros corpos de água, além de atuarem como controladores biológicos naturais do *B. glabrata*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni* (CIMERMAN & CIMERMAN, 2005).

Pomacea lineata está sujeito a informações conflitantes por parte da sociedade, pois assim como muitos animais silvestres, é comumente utilizado na dieta, em preparos de pratos regionais como, por exemplo, aruazada, aruá ao coco e cozido na casca da laranja. No entanto, muitas pessoas o eliminam por acreditarem que se trata de um provável hospedeiro do *S. mansoni* parasita causador da esquistossomose, doença endêmica da região. É importante destacar que essa espécie também possui grande importância na cadeia alimentar, pois servem de alimento para peixes, anfíbios, répteis, entre outros animais (PULINI & PAULINI 1971).

Esse molusco também pode ser considerado como um valioso recurso para monitorar a qualidade da água no nordeste do Brasil, no entanto comporta-se como praga em plantações de arroz no Oriente (COLER, 2005). Em diversas regiões do Brasil, suas conchas são utilizadas para a confecção de artesanatos, seus ovos são também usados como terapêuticos caseiros contra diarreia e doenças respiratórias, representando um fator relevante na economia local (PESSÔA et al., 2007).

Além disso, é muito importante estudar a estrutura interna dos Gastrópodes, o que pode esclarecer como várias doenças são transmitidas, um exemplo disso foi o trabalho de Machado et al. (1988), onde avaliaram quais os órgãos que foram mais atingidos pelos esporocistos de *S. mansoni* nos

caramujos, sendo o pé o mais afetado, como também o hepatopâncreas e o ovários (MELO & GENARO, 2001).

2.3. Gônadas

Os gastrópodes são animais que possuem sexos separados (dióicos), cujos machos possuem um pênis que se origina na borda do manto e aloja-se num saco basal, denominado saco ou bolsa do pênis. Quando ereto prende-se ao redor de sua porção basal por uma bainha grande e muscular. Quando em repouso, o pênis apresenta-se enovelado no interior do saco peniano; a prega interna da bolsa é formada por um prolongamento da base do pênis (MESQUITA, 1982).

Nas fêmeas o ovário, também conhecido por glândula de albúmen, é constituído por túbulos ramificados branco-amarelados, situados superficialmente sobre a glândula digestiva. Segundo Mesquita; Coelho; Santos (1990) a histologia da glândula de albúmen em *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Pilidae) assemelha-se muito às glândulas de albúmen e da casca nas aves.

O oviduto é estreito correndo pelo eixo columelar até a base da espira. Já o receptáculo seminal é tubular, com parede espessa e extremidade proximal alargada. A glândula de albúmen é bastante volumosa e rosada, envolvendo o receptáculo seminal e a glândula da casca em espiral, sendo a mesma um vestígio do aparelho copulador masculino (pênis e sua bainha) (THIENGO, 1987).

A glândula de albúmen apresenta correlação somente com a glândula prostática e a produção da massa de ovos. Tratando-se de animais dióicos, nos machos, a presença da bainha do pênis (na borda direita do manto) permite a distinção dos sexos na dissecação. Esta distinção, no entanto, pode ser dificultada pela presença, nas fêmeas, de um pênis rudimentar localizado na mesma região dos machos. 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).

2.4. Estivação

Uma característica bastante conhecida dos gastrópodes é a estivação (BARBOSA & BARBOSA, 1959; IMLAY, 1968; GOMES et al., 1975; MILWARD DE ANDRADE, 1981; KRETZSCHMAR & HECKMAN, 1995; BRONSON, 2002), uma adaptação de sobrevivência bastante comum, inclusive em gastrópodes pulmonados, quando estão diante de condições desfavoráveis, que consiste na diminuição de atividade durante uma época desfavorável de seca ou calor (TELES & MARQUES, 1989). Barbosa e Dobbin Junior (1952a,b) demonstraram, em laboratório, que *B. glabrata* sobrevive em quase completa dessecação por um período acima de cinco meses. Raut e Chose (1977, 1981) avaliaram os fatores relacionados com a mortalidade durante o período de estivação. A ausência dessas informações impossibilitou o sucesso das tentativas de controle e/ou extermínio do caramujo africano *A. fulica*.

Durante a época de estiagem *P. lineata* se enterram no solo e sobrevivem graças a sua capacidade de estivação (LUM-KONG & KENNY, 1989). Estivação é um fenômeno muito pouco conhecido, particularmente entre as espécies neotropicais. Antes a definição do termo estivação era pobre, pois alguns estudiosos denominam apenas como “sono de verão”, 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. O intrigante é o fato dos mesmos fatores químicos indutores da estivação, produzirem o estado semelhante ao torpor quando injetados em mamíferos (ROJAS et al., 2000).

Diversas espécies de moluscos apresentam estratégias fisiológicas e comportamentais à estivação, tais como: a retração da massa cefalopodal no interior da concha e o enterramento, que garantem a sobrevivência e o sucesso reprodutivo durante períodos desfavoráveis, com altas temperaturas e baixa ou nenhuma umidade (ARAD, 1993; EMBERTON, 1994). De acordo com a literatura, a umidade influencia aspectos do ciclo de vida dos moluscos, tais como a alimentação, o ritmo dos batimentos cardíacos, a locomoção, o crescimento, os níveis de carboidratos, de proteínas e de lipídeos, bem como a espermatogênese e a produção e incubação dos ovos (COOK, 2001; FURTADO; BESSA; CASTANON 2002; D'ÁVILA & BESSA 2005).

Quando em estivação os moluscos apresentam redução das reservas de carboidratos, passando a utilizar outros substratos para a obtenção de energia (PINHEIRO, 1996). Lira et al. (2000) observaram que no período de inanição de 30 dias, a concentração de proteínas no organismo de *Bradybaena similis* (FÉRUSSAC, 1821), mostrou uma tendência a decrescer, atingindo valores 70% abaixo do normal, indicando que o molusco estava metabolizando proteínas.

Estivação é um estado de quietude comportamental e metabólica que ocorre em resposta à seca e/ou alta temperatura ambiente em vertebrados e vários invertebrados e pode ser associado a uma depressão metabólica profunda (GUPPY & WITHERS, 1999), nos períodos de estivação a proteína muscular é degradada em aminoácidos para síntese das proteínas essenciais, e em cetoácidos, para a gluconeogênese, visando à manutenção das concentrações sanguíneas de glucose (BAYNES & DOMINICZAK, 2000).

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 (PINTER; STOREY; UUTSCH, 1992). Isso sugere a existência de ritmos endógenos intrínsecos associados a ciclos metabólicos (PINTER; STOREY; UUTSCH, 1992).

As estratégias excretoras dos moluscos têm sido um importante elemento de muitos estudos ecofisiológicos. Os custos benefícios são claros e podem ser prontamente entendidos nos termos dos limites ambientais e ecológicos do animal, tais como: disponibilidade de água, estratégias alimentares, custos metabólicos e reprodução (MOYES & SCHULTE, 2010).

2.5 Carboidratos

Os moluscos evoluíram de maneira a se tornarem capazes de utilizar o oxigênio atmosférico para o processo de produção de energia (ATP). Para a produção do ATP é necessário à degradação de moléculas orgânicas adquiridas na alimentação e armazenadas para uso posterior. Os carboidratos representam o principal tipo dessas moléculas energéticas que são oxidadas

até CO₂ e H₂O na presença de oxigênio. Esse processo ocorre dentro das mitocôndrias através da cadeia transportadora de elétrons que termina com a redução do oxigênio molecular (LUTZ & STOREY, 1997).

Nos períodos de anoxia os carboidratos são catabolizados através da glicólise, ou participa de outra rota metabólica denominada de via do succinato. Essa via reoxida o NAD, que foi produzido no início da via glicolítica, através da fosforilação realizada pelo sistema de transporte de elétrons no qual o fumarato, ao invés do oxigênio, é o receptor final de elétrons. Esta via esta presente em organismos que habitam substratos lodosos anóxicos e geram mais ATP por resíduo de glicose do que as vias do lactato (LIVINGSTONE, 1991).

Pinheiro (1996) observou que os níveis das reservas carboidratos reduzem nos períodos de estivação na espécie *Bradybaena similis*, usando assim outras fontes energéticas. Essas variações ocorrem em caracóis terrestres que apresentam dois períodos férteis por ano, na primavera e no outono, ou seja, no final dos períodos de inverno e verão de dormência, essas variações sazonais ocorrem também em lipídios e proteínas em todo o animal. Estes recursos são mobilizados durante os períodos de privação de alimento e/ou estresse ambiental, coincidindo com a maturação das gônadas (WILLIAMS, 1970).

Nos períodos de estivação varias enzimas atuam para suprimir a oxidação de carboidratos (WHITWAM & STOREY, 1990a,b). Estudos *in vitro* indicam que estas mudanças são mediadas por proteínas quinase, que possuem papel importante na supressão de numerosos processos celulares nesse período (WHITWAM & STOREY, 1990a; BROOKS & STOREY, 1995).

Outra estratégia mostrada por Moreira et al. (2003) esta relacionada a manutenção do pH da hemolinfa, durante a estivação do *Bradybaena similis* (Férussac, 1821), há o acúmulo de ácidos orgânicos e produtos nitrogenados, oriundos da elevada degradação de carboidratos, por meio do metabolismo aeróbico e da degradação de proteínas, causando alterações no pH da hemolinfa, que é novamente regulado através da mobilização de CaCO₃ da concha. Além disso, durante períodos de estivação, o aumento da tensão de CO₂ na hemolinfa dos moluscos resulta em uma diminuição do pH da hemolinfa e das células cardíacas.

2.6 Ácido Úrico

Pesquisas são realizadas na tentativa de elucidar os mecanismos biológicos envolvidos no metabolismo de excreção do nitrogênio. Adaptações exibidas por estivantes foram discutidas em relação à indução, manutenção, e as fases de excitação de estivação (IP & CHEW, 2010), sendo constatado que os níveis de ácido úrico aumentam durante tal processo (GIRAUD-BILLOUD et al., 2011).

Giraud-Billoud et al., (2011) relataram que nos períodos de estivação e pós estivação, ocorre aumento nos níveis de ácido úrico, com função de antioxidante e receptor de oxigênio. Vários autores (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998;. HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVIN, 2002; RAMOS-VASCONCELOS et al., 2005; NOWAKOWSKA et al., 2009) mostraram que existem diferentes mecanismos enzimáticos para proteger os gastrópodes pulmonados dos efeitos prejudiciais da re-oxigenação durante o retorno da estivação. Em contraste o ácido úrico tem sido mostrado como um provável antioxidante não enzimático em humanos (AMES et al., 1981; BECKER, 1993), sugerindo que também pode desempenhar tal papel no retorno da estivação (HERMES-LIMA; STOREY, 1995; VEGA et al., 2007;. GIRAUD-BILLOUD et al., 2008).

Em condições normais, os moluscos terrestres excretam principalmente uréia, cujo processo é mais vantajoso do que a excreção de ácido úrico, uma vez que a esta última pode ser excretada de forma muito diluída evitando assim a intoxicação do molusco (BISHOP; ELLIS; BURCHAM, 1983). Com o passar da estivação o processo uricotélico se torna muito mais vantajoso no que diz respeito à economia de energia em relação à uréia, pois mesmo custando mais para ser produzido (7 ATP) ele possui uma grande quantidade de nitrogênio (4N). Assim, o ácido úrico (7 ATP; 1,75 ATP/N) é levemente mais econômico do que a ureia (5 ATP; 2,5 ATP/N) (MOYES; SCHULTE, 2010).

Além das vantagens energéticas, na redução da toxicidade e economia da eliminação da água, um dos produtos da oxidação do ácido úrico é a alantoína que pode ser produzida espontaneamente (quando o ácido úrico age como um acceptor de elétrons) ou pela enzima urato oxidase na catálise (COWIE, 2002),

funcionando juntamente com o ácido úrico como um antioxidante natural para o gênero *Pomacea* (GIRAUD-BILLOUD et al., 2011).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B.N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P., Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **P. of the N. Acad. of Scie. USA**, v. 78, p.6858–6862. 1981.

ANDREWS, E.B., The functional anatomy of the mantle cavity, kidney and blood system of some pilids gastropods (Prosobranchia). **J. of Zool**, v. 146, p. 70–94, 1965.

ARAD, Z. Water relations and resistance to desiccation in three Israeli desert land snails, *Eremina desertorum*, *Euchondrus desertorum* and *Euchondrus albulus*. **J. of A. Envir.** v. 24, p. 387-395, 1993.

BARBOSA, F.S.; BARBOSA, I. Observations on the ability of the snail *Australorbis nigricans* to survive out of water in laboratory. **J. of Paras.** v. 45, n. 6, p. 627-630, 1959.

BARBOSA, F.S.; DOBBIN JUNIOR, J.E. Effects of the dry season on *Australorbis glabratus* (Mollusca, Planorbidae). **P. A. do Inst. A. M.** v. 1, n. 11, p. 145-148. 1952b.

BARBOSA, F.S.; DOBBIN JUNIOR, J.E. Resistência de *Australorbis glabratus* à dessecação em condições naturais. **P. A. do Inst. A. M.** v. 1, n. 11, p. 141-144. 1952a.

BARBOZA, S. H. R. Estudos tecnológicos comparativos da carne e subprodutos dos moluscos *Achatina fulica* (escargot) e *Pomacea lineata* (aruá). 2002. 132 f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, 2002.

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*). **A. e Nut.**, Araraquara. v.17, n.4, p.413-418, out./dez. 2006.

- 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 pp. 1997.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica médica**. Editora Manole, Cap.18;28, pág. 218; 260, 1ed. São Paulo, 2000.
- BECKER, B.F., Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biology and Medicine*. v. 14, p. 615–631, 1993.
- BERTHOLD, T. Vergleichende Anatomie, Phylogenie und Historische Biogeographie der Ampullariidae (Mollusca:Gastropoda). **A. Naturwiss V. Ham.** v. 29, p. 1–256. 1991.
- BEZERRA, J.C.B.; KEMPER, A.; BECKER,W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. **M. do I. O. C.**, v. 94, n. 6,: p. 779-784, 1999.
- BISHOP, S.H.; ELLIS, L.L. BURCHAM JM, Amino acid metabolism in molluscs. *Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*. In - **The M.** Academic Press, New York, USA. v.1: 243-327. 1983.
- BRONSON, C.H. Apple snails. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, **T. bul.**, no. 3. Tallahassee, Florida, USA. 2002.
- BROOKS, S.P.J.; STOREY, K.B. Protein phosphorylation patterns during aestivation in the land snail *Otala lactea*. **Mol. and Cel. Bioch.**; v. 143, p. 7–13, 1995.
- BURKY, K.A.; BURKY, A.J. Buoyancy changes as related to respiratory behavior in an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Muüller), from Venezuela. **Naut.** 91:97–104, 1977.
- CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais. 2ª Ed. São Paulo – Editora Atheneu, p. 212-221. 2005.
- CIRELLI, K.R.N. Caracterização nutricional e sensorial do aruá (*Pomacea lineata* (Spix, 1827)). 1992. 68 f. Tese (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1992.

- COLER, R. A.; COLER, R. R.; FELIZARDO, E. K. G. WATANABE, T. Applying Weight Gain in *Pomacea lineata* (SPIX 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a Measure of Herbicide Toxicity. **Braz. Jou. of Bio.** 65(4): 617-623, 2005.
- COOK, A. Behavioral ecology, In: BARKER, G. M. (Ed.). The Biology of terrestrial mollusks. New Zeland, **CABI Pub.** p. 447-488, 558p. 2001.
- COWIE, R., In: Baker, G.M. (Ed.), Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. **CABI**, Wallingford, pp. 145–192. 2002.
- 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. **Ver. Brás. de Zool.** v. 22, n. 2, p. 349-353, 2005.
- DIAZ, J.M.M. & PUYANA, M.H. Moluscos del Caribe colombiano. Santafé de Bogotá, Calciencias y Fundación **Nat.**, 291p. 1994.
- EMBERTON, K.C. Morphology and aestivation behaviour in some madagascan acavid land snails. **Biol. jou. of the Linne. Soc.** 53: 175-187. 1994.
- FOOD, and nutrition board: recommended dietary allowances. 9 th ed. Washington, DC: **Nat. Acad. of Scie.** 750: p. 1980.
- FURTADO, M. C. V.; BESSA, E. C. A.; CASTANON, 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. de Zooc.** v. 4, n. 2, p. 229-300, 2002.
- GIRAUD-BILLOUD, M.; KOCH, E.; VEGA, I.A.; GAMARRA-LUQUES, C.; CASTRO-VAZQUEZ, A., Urate cells and tissues in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata*. **Jou. of Moll. Stud.** 74: p. 259–266. 2008.
- GIRAUD-BILLOUD, M.; ABUD, M,A.; CUETO, J.A.; VEGA, I.A.; CASTRO-VAZQUEZ, A.; Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*. **Comp. Bioch. and Phys.** Part A 158: 506–512. 2011.
- GOMES, P.A.C.; NURENBERG, S.; PIMENTEL NETO, M.; OLIVEIRA, G.P.; REZENDE, H.E.B.; ARAÚJO, J.L.B. & MELLO, R.P. Biologia da *Lymnaea*

- columella* Say, 1817 (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). **Arq. do Mus. Nac.** 55: p.67-70. 1975.
- GUIMARÃES, C. T. Algumas observações de campo sobre biologia e ecologia da *Pomacea haustum* (Reeve, 1856) (Mollusca, Pomacea). **Ver. Mem. do Inst. O. C.**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 1, p. 33-46, 1981.
- GUPPY, M., WITHERS, P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biol. Rev. of the Camb. Soc.** v.74, 1–40. 1999.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B., Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase from an estivating land snail. **Z Naturf. C. J. Biosci.** v.50, 685–694. 1995.
- HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVIN, T., Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp. Bioch. and Phys.** v. 133, 537–556. 2002.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B., Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp. Bioch. and Phys. B** 120, 437–448. 1998.
- HICKMAN, JR.C.P.; LARRY, S.R.; LARSON, A. *Princípios Integrados de Zoologia*, Editora Guanabara Koogan S.A., 11ed. Ed em português. 2004.
- IMLAY, M.J. – 1968 – Resistance of fresh-water operculate snails to desiccation. **The Naut.** v. 81 (4):138-140.
- IP, Y.K.; CHEW, S.F. Nitrogen Metabolism and Excretion During Aestivation. *Prog. in Mol. and Subce. Biol.* Volume 49, 63-94, DOI: 10.1007/978-3-642-02421-4_4, 2010.
- JIMÉNEZ-TABATA, A.; FINOL, H.J.; MARTÍNEZ R.E., Ultrastructural changes in myocardial fibers of a mollusc, *Pomacea urceus*, during aestivation. *Cell and Tiss. Res.* V. 242, Issue 3, pp 677-679. December. 1985.
- KRETZSCHMAR, A.U. & HECKMAN, C.W. Estratégias de sobrevivência das espécies de Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda) durante mudanças das condições ambientais extremas do ciclo sazonal sob o clima tropical úmido-e-seco. *Act. Lim. Bras.*, V.7: 60-66. 1995.

LIVINGSTONE, D.R. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. **Amer. zool.**, v.31: p.522-534.1991.

LIRA, C.R.S., E.M GOMES, G.M. CHAGAS & J. PINHEIRO. 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 (4):907-913. 2000.

LUM-KONG, A.; KENNY, J. S.; The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). **Jour. of Moll. Stud.** 55: 53-65. 1989.

LUTZ, P. L., STOREY, K. B. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In Handbook of Physiology, Section 13, **Comp. Phys.** Vol. 2 (ed. W. H. Dantzler), p. 1479-1522. Oxford: Oxford University Press. 1997.

MACHADO, S.M.P.; MAGALHÃES, L.A.; ARTIGAS, P.T.; CORDEIRO, N.S.; CARVALHO, J.F., Verificação de Antagonismo Entre Larvas de *Schistosomamansoni* e Larvas de outros Digenea em *Biomphalaria Tenagophila* Molusco Planorbídeo de criadouro natural situado na região De Campinas, SP, BRASIL. **Ver. de Saú. Pub. S. P.**, 22(6): 484-8, 1988.

MCCLARY, A. Surface inspiration and ciliary feeding in *Pomacea paludosa* (Prosobranchia: Mesogastropoda: Ampullariidae). **Malac.** (2): p. 87–104, 1964.

MELO, D. P.; GENARO, O., Esquistossomose. In: REY, L. **Parasitologia** 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 204-223. 2001.

MELO, L. E. L., O uso do Gastrópode *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.

MELO, L.E.L.; COLER, R.A.; WATANABE, T.; BATALLA, J.F., Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism, **Hydrob.** 429: 73–78, 2000.

MESQUITA, E. F. M; Anatomia e histologia do aparelhoreprodutor e dados biológicos de *Pomacea sp*(Mollusca, Gastropoda, Pilidae). Rio de Janeiro, 88p.

Dissertação (Mestrado) - Departamento de Invertebrados, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1982.

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). **Ver. Brás. de zool.** 7 (1-2) : 197-206, 1990.

MILWARD DE ANDRADE, R. Resistência à dessecação de *Pomaceae haustum* (Reeve, 1856) capturadas no Lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG (Brasil) (Mollusca, Pilidae). **Ver. Bras. de Biol.** 41(1):215-221. 1981.

MOREIRA, C.S.D.R.; GOMES, E.M; CHAGAS G.M.; PINHEIRO, J. Calcium changes in *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) under starvation. **Ver. Brás. de Zooc..** 5 (1):45-54. 2003.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Princ. de Fisiol. Ani.**, São Paulo, 2º ed. Cap. 10. Pág. 495. 2010.

NOWAKOWSKA, A.; SWIDERSKA-KOLACZ, G.; ROGALSKA, J.; CAPUTA, M., Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. **Comp. Bioch. and Phys.**, C 150, p.481–486. 2009.

PACHECO, P.; MARTINS, M.F.; LUCHES, M.; RIBEIRO, S.A.; SPERS, A. & RODRIGUES, P.H.M. Estudo do desempenho ponderal do escargot *Achatina fulica* em diferentes tipos de solo. **Arq. do Inst. Biol.** 65: 9-12. 1998.

PAIN, T. *Pomacea* (Ampullariidae) of the Amazon River System. **J. Conchol**, v. 24, n. 12, p. 421-432, Dec. 1960.

PAULINI, H. M. & PAULINI, E. Observações de laboratório sobre controle biológico de *Biomphalaria glabrata* pela *Pomacea* sp.(Ampullariidae). **Rev. Bras. de Malario. e Doen. Trop.**, 23: 135-149. 1971.

PESSÔA, H.L.F.; OLIVEIRA, R.C.M.; SILVA, J.L.V.; SANTOS, R.F.; DUARTE, J.C.; COSTA, M.J.C.; SILVA, B.A., Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda), **Rev. Bras. de Farmacog.** 17(1): 76-84, Jan./Mar. 2007.

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 Techn.** 39 (2):349-357. 1996.

- PINTER, A.W.; STOREY, K.B. & UUTSCH, G.R. Estivation and Hibernation. In: Environmental Physiology of the Amphibians, FEDER, M.E. & BURGGREEN, W.W. (eds). **Press for univer. of Chic.** pp. 250-274. 1992.
- RAMOS-VASCONCELOS, G.; CARDOSO, L.; HERMES-LIMA, M., Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. **Compar. Biochem. and Phys.C** 140, p.165–174. 2005.
- RAUT, S.K. & G.M. BARKER. *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as Pests in Tropical Agriculture, p. 55-114. In: G.M. BARKER (Ed.). *Molluscs as Crop Pests*. New Zealand, Ed. **CAB Publis.** 576p. 2002.
- RAUT, S.K. & K.C. CHOSE. Effect of upwardly-directed shell aperture on the aestivating land snail *Achatina fulica*. **Naut.** 91: 31-32. 1977.
- RAUT, S.K. & K.C. CHOSE. Factors influencing mortality in land snails, *Achatina fulica* Bowdich and *Macrochlamys indica* Godwin-Austen during aestivation. **Proceed. of the Zoolog. Soc. of Lond.** 32: 107-120. 1981.
- ROJAS, J.M.; FARIÑA, J.M.; RUBEN, E.; SOTO & BOZINOVIC, F., Variabilidad grografica em la tolerancia termica y economia hidrica Del gastropodo intermareal *Nodilittorina peruviana* (Gastropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822). **Rev. Chil. de Hist. Nat.**, Santiago, v. 73. N.3, p. 543-552,2000.
- RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. *Zoologia dos Invertebrados*. 6 ed. São Paulo: Editora Roca,1996.
- SANTOS, E. *Os moluscos (vida e costumes)*. Belo Horizonte. Editora Itatiaia 1982.
- SEUFFERT, M.E.; MARTÍN, P.R. Influence of temperature, size and sex on aerial respiration of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from Southern Pampas, Argentina. **Malac.** 51:191–200, 2009.
- TELES, H.M.S. & MARQUES, C.C.A. Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae). **Ver. de Saú. Púb.** 23: 76-78. 1989.
- THIENGO, S.C. Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824). In: Barbosa, FS (org.) **Tóp. em malac. méd.** Rio de Janeiro - Editora Fiocruz, p. 50-69. 1995.
- THIENGO, S.C. **Ver. Mem. do Inst. Osv. Cruz.** v. 82, n. 4,1987.

THIENGO, S.C. Tirando a limpo a praga dos caramujos africanos. Disponível em: <http://www2.uerj.br/~sbma/acathinafulica.htm>. Acesso em: 07 jun. 2004.

VEGA, I.; GIRAUD-BILLOUD, M.; KOCH, E.; GAMARRA-LUQUES, C.; CASTRO-VAZQUEZ, A., Uric acid accumulation within intracellular crystalloid corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). **Veliger**, v.48, p.276–283. 2007.

WHITWAM, R.E.; STOREY K.B. Pyruvate kinase from the land snail *Otala lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. **Jour. of Experim. Biol.**;v.154:p.321–37, 1990a.

WHITWAM, R.E.; STOREY K.B. Regulation of phosphofructokinase during estivation and anoxia in the land snail *Otala lactea*. **Phys. Zoolog.**; v.64: p.595–610, 1990b.

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

CAPITULO II

Análise dos níveis de carboidratos e ácido úrico na hemolinfa de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) em estivação induzida e sua influência sobre a histologia gonadal.

Gyl Everson de Souza Maciel¹; Maria Adelia Borstelmann de Oliveira¹; Valeria Wanderley-Teixeira¹; Carina Scanoni Maia²; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto¹; Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves³; Luiz Carlos Alves³; Fábio André Brayner³; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^{1*}

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Brasil.

² Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba - Brasil

³ Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-Universidade Federal de Pernambuco - Brasil

*Contato: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, CEP 52171-900. Tel.: (81) 3320.6389. E-mail: alvaro@dmfa.ufpe.br

RESUMO

Pomacea lineata (Spix, 1827) durante a época de estiagem se enterra no solo e sobrevive graças a sua capacidade de estivação. Estudos têm mostrado que durante a estivação os níveis de carboidratos e ácido úrico, podem fornecer informações mais precisas sobre o desempenho das gônadas em resposta ao estresse ambiental. Assim, testou-se a hipótese de que as variações nos níveis de carboidratos e ácido úrico, durante a estivação induzida, podem afetar a histologia gonadal e gametogênese em *P. lineata*.

Os caramujos foram induzidos à estivação por três, cinco e 10 meses. Testículos e ovários foram coletados e processados para análises histológicas. Os resultados mostraram aumento significativo dos níveis de carboidratos e ácido úrico proporcionalmente ao período de estivação, além de alterações histológicas nas gônadas e considerável redução da gametogênese. Dessa forma, concluiu-se que em *P. lineata* quanto maior o período de estivação, maior será a disponibilização de carboidratos e excreção de ácido úrico, garantindo assim, a integridade do aparelho reprodutor e da gametogênese.

PALAVRAS-CHAVE: gastrópodes, gônadas, estivação, histologia, ácido úrico, carboidrato.

1. Introdução

Os animais utilizam diversas estratégias para resistir ao estresse ambiental provocado pelas mudanças sazonais de temperatura, umidade, alimentos, disponibilidade de água, salinidade e concentração de oxigênio (Hermes-Lima; Zenteno-Savin 2002; Hermes-Lima et al., 2004; Storey & Storey 2011, 2012). Uma dessas estratégias é a estivação, um estado de quietude comportamental e metabólica que ocorre em resposta à seca e/ou alta temperatura ambiente em vertebrados e vários invertebrados (Guppy; Withers 1999). Nos períodos de estivação ocorre degradação das proteínas em aminoácidos para síntese das proteínas essenciais, e em cetoácidos, para a gluconeogênese, mantendo assim as concentrações de glicose em níveis vitais (Baynes; Dominiczak 2000).

Os mecanismos fisiológicos da estivação foram estudados principalmente em anfíbios e gastropodes (Hermes-Lima; Zenteno-Savin 2002; Storey 2002). Com relação aos gastrópodes eles podem permanecer em estivação por muitos meses ou mesmo

anos, até que as condições favoráveis permitir-lhes a retomar os processos vitais de nutrição e reprodução (Whitman; Storey 1990). Durante estes períodos prolongados de inanição, os nutrientes armazenados anteriormente são metabolizados, sendo o carboidrato, o primeiro destes materiais a ser utilizado (Rossi; Da Silva 1993; Da Silva; Zancan 1994). Quando este metabolito é esgotado, o animal mobiliza reservas lipídicas e, finalmente, as proteínas são usadas como último recurso (Matsuzawa et al. 1991).

Na maioria das espécies de moluscos terrestres os produtos nitrogenados de degradação são excretados principalmente como uréia ou ácido úrico e outros compostos de purina. Em condições normais, estes animais excretam uréia, cujo processo é mais vantajoso do que a excreção de ácido úrico, uma vez que esta pode ser excretada muito diluída evitando assim a intoxicação do molusco (Bishop et al., 1983). No entanto, durante a estivação um dos eventos adaptativos a condição adversa também está relacionada ao metabolismo de excreção de nitrogênio. (Ip & Chew 2010; Giraud-Billoud et al. 2011).

No Brasil o caramujo de água doce *Pomacea lineata* (Spix, 1827) possui distribuição setentrional e litorânea, sendo encontrados em habitat dulcícolas desde o Nordeste até o Sudeste do País. Têm uma posição chave na cadeia alimentar servindo de alimento para muitos animais, e pode ser um recurso valioso para monitoramento da qualidade da água no Nordeste do Brasil (Fellerhoff 2002; Coler et al., 2005). a duração da seca pode variar de ano para ano, podendo chegar a quase um ano sem chover em determinados locais do nordeste brasileiro (Rao; Satyamurti; Brito 1986). Durante a época de estiagem este molusco se enterra no solo e sobrevive graças a sua capacidade de estivação (Lum-Kong; Kenny 1989; Kenneth 2001).

Estudos têm mostrado que durante a estivação ocorre a perda de peso (Moreno-Rueda 2008) e alterações na estrutura histológica dos órgãos internos (Jahan et al.,

2007; Bhattacharyya et al., 2012), o que pode afetar diretamente a atividade reprodutiva dos caramujos (Cook 2001; Storey 2002), pois o sucesso da reprodução depende diretamente das reservas energéticas armazenadas (Delgado & Camacho 2005). Tem sido relatado que os indicadores bioquímicos, principalmente os níveis de carboidratos e ácido úrico, podem fornecer informações mais precisas sobre o desempenho das gônadas em resposta ao estresse ambiental (Smolders et al. 2005).

Assim, resolvemos testar a hipótese de que as variações nos níveis de carboidratos e ácido úrico, durante a estivação induzida, pode afetar a histologia gonadal e gametogênese em *P. lineata*. As informações obtidas podem ser úteis para compreender o comportamento reprodutivo dessa espécie frente às mudanças ambientais, em especial nas regiões climaticamente imprevisíveis, como o ecossistema do semi-árido nordestino.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Caramujos *P. lineata* foram coletados nos tanques da Estação de Piscicultura Johei Koike no Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco e transferidos para aquários do Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA-UFRPE). Esses caramujos permaneceram em um aquário (60 cm de comprimento, 25 cm de largura e 40 cm de altura) com água, a uma temperatura de 25° C, por um mês para adaptação. Durante esse período foram alimentados diariamente com folhas de alface. Para o experimento foram utilizados indivíduos adultos com massa corpórea de $25,0 \pm 0,19$ g, comprimento de $36,0 \text{ mm} \pm 1,34 \text{ mm}$, os quais foram alojados em aquários (30 caramujos/aquário) com capacidade de 10 L de água, para a formação dos seguintes grupos experimentais: I – caramujos mantidos sob condições hídricas normais; II –

caramujos mantidos sob estivação por três meses; III – caramujos mantidos sob estivação por cinco meses, e IV – caramujos mantidos sob estivação por 10 meses.

2.2 Indução da estivação

O processo de indução à estivação dos caramujos dos grupos II, III e IV foi realizado através da retirada gradual de 1L de água a cada dois dias. Ao término da água dos aquários, os caramujos foram colocados em bandejas de 25,5 cm x 18,0 cm, para o início do período de estivação (3, 5 e 10 meses respectivamente), representando os períodos de seca do nordeste brasileiro, sendo feita ainda restrição à alimentação.

2.3 Coleta da hemolinfa

Para coleta da hemolinfa foi feita uma abertura na concha, na região que corresponde ao local onde se encontra a cavidade pericárdica. Com seringa tipo insulina, foram retirados até 1,0 mL de hemolinfa diretamente da câmara ventricular do coração de cada caramujo, a qual foi centrifugada e o sobrenadante acondicionado em eppendorfs e congelados a -20°C, até o momento das dosagens. Foram utilizados 10 caramujos por grupo.

2.4 Dosagem de ácido úrico

Os níveis de ácido úrico foram determinados através de reagentes da Labteste Diagnostica S.A. e leitura no espectrofotômetro Analyzer 500E, por meio de filtro de 505 nm.

2.5 Dosagem de carboidratos totais

Foi utilizado o protocolo adaptado de Laurentini; Edwards (2003). Um volume de 40 μ L dos padrões, branco e amostras foi adicionado em cada poço da placa de microtitulação. Essa placa foi envolvida com papel filme, agitada suavemente e incubada a temperatura de 4°C por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado um volume de 100 μ L da solução de antrona-ácido sulfúrico, preparada durante a incubação, em cada poço. A placa foi novamente selada, agitada suavemente e incubada em banho de água aquecida sem agitação à temperatura de 92°C por 3 min. Para interrupção da reação a placa foi transferida, posteriormente, para superfície a temperatura ambiente por 5 min. Após isso, a placa foi deixada em repouso em banho de água aquecida sem agitação à temperatura de 45°C. Foi retirada, seca e submetida à leitura do comprimento de onda de 620nm em leitora de microplaca (Anthos2010 MicroplateAbsorbance Reader, Biochrom Ltda, Cambridge, UK).

2.5 Análise histológica

Para análise histológica utilizou-se cinco machos e cinco fêmeas de cada grupo para retirada das gônadas as quais foram fixadas em formol a 10% por 48 h. Posteriormente, estes órgãos foram clivados transversalmente e longitudinalmente, obtendo-se fragmentos, os quais foram inicialmente desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos pelo “paraplast”. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 μ m. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em seqüência, os cortes foram submetidos às técnicas colorações pela Hematoxilina - Eosina (H. E.), e analisados em microscópio óptico de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.6 Análise Estatística

Para a comparação das dosagens de ácido úrico e carboidratos totais foram realizadas a Análise de variância, quando significativa esta complementada pelo teste t-Student ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Dosagens do ácido úrico

As concentrações de ácido úrico na hemolinfa mostraram aumento significativo e progressivo nos caramujos dos grupos estivantes, quando comparadas as concentrações observadas nos caramujos do grupo I (Fig. 1). Proporcionalmente as concentrações de ácido úrico, em relação aos animais do grupo I, aumentaram 3,7 vezes no grupo II, 9,12 vezes nos animais do grupo III e 19,94 vezes nos animais do grupo IV.

3.2 Dosagens de carboidratos totais

Os níveis de carboidratos totais na hemolinfa mostraram também aumento significativo e progressivo nos caramujos dos grupos II, III e IV, quando comparados aos observados nos caramujos do grupo I (Fig. 2). Proporcionalmente as concentrações de carboidratos totais, em relação aos animais do grupo I, aumentaram 1,18 vezes no grupo II, 1,44 vezes nos animais do grupo III e 1,86 vezes nos animais do grupo IV.

3.3 Análise histológica dos testículos de *P. lineata*

Nos caramujos *P. lineata* do grupo controle foi observado revestindo a gônada, um epitélio simples pavimentoso com numerosas células pigmentadas, o qual está apoiado numa delgada camada de tecido conjuntivo frouxo que emite septos para o

interior do órgão separando os numerosos túbulos seminíferos. Nos túbulos seminíferos evidenciou-se espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides (Figs. 3A e 3B). Nos caramujos dos grupos submetidos à estivação, já a partir do terceiro mês observou-se uma desorganização do epitélio seminífero, caracterizada pela ausência de alguns tipos celulares, principalmente dos espermatócitos e espermatídes, porém foi possível notar a presença de espermatozóides (Figs. 3C e 3D).

3.4 Análise histológica dos ovários de *P. lineata*

Os ovários de *P. lineata* independente do tratamento apresentaram-se revestidos por tecido conjuntivo que penetra na gônada preenchendo os espaços entre os folículos ovarianos, os quais mostraram-se menos desenvolvidos nas fêmeas submetidas a estivação, independente do período (Figs. 4A e 4B). No interior desses folículos foi possível observar ovogônias no epitélio germinativo e ovócitos em desenvolvimento, inclusive livres no lúmen dos folículos nas fêmeas do grupo controle, enquanto que nas fêmeas submetidas à estivação os ovócitos estavam aderidos à parede do folículo (Figs. 4C e 4D).

4. Discussão

O sucesso da reprodução de qualquer ser vivo depende diretamente das reservas energéticas armazenadas (Delgado & Camacho 2005), e durante a estivação os elementos críticos para a sobrevivência são a capacidade de retenção de água e a disponibilidade dessas reservas energéticas (Storey 2002).

Os níveis de ácido úrico em *P. lineata* aumentaram com o passar do período de estivação, resultados semelhantes foram relatados em pesquisa realizada no gastrópode *Bradybaena similares* (Fèrussac 1821) onde Lira et al. (2000) observaram que no

período de inanição de 30 dias, a concentração de proteínas reduziu atingindo um valor de 70% abaixo do normal, indicando que o molusco estava metabolizando proteínas.

É importante ressaltar que o intenso catabolismo das proteínas relatado por Becker (1993) leva ao aumento na produção de ureia na excreção dos caramujos. No entanto, no caso da espécie *P. lineata* em estivação os animais não podem excretar ureia e para tanto, a mesma precisa ser convertida em ácido úrico, um produto menos tóxico e que reduz a necessidade da perda de água durante sua eliminação.

Os nossos resultados fortalecem a idéia de que ocorre alterações histológicas nos órgãos internos envolvidos na manutenção da sobrevivência desses animais (Jahan et al. 2007; Bhattacharyya et al. 2012), podendo afetar sua atividade reprodutiva (Cook 2001; Storey 2002). Entretanto, devemos mencionar que o elevado nível de ácido úrico pode está relacionado com mecanismo de proteção, exercendo ação antioxidante, já que é essencial para minimizar os potenciais efeitos nocivos do estresse oxidativo produzido pela estivação (Storey & Storey 2012). O mecanismo de ação inclui ativação de cascatas de sinalização intracelular, a fosforilação de proteínas e regulação de genes seletivos (Moyes & Schulte 2010).

Os níveis de carboidratos totais também aumentaram progressivamente ao período de estivação. Segundo Lira et al. (2000) o jejum severo do molusco *Bradybaena similaris* (Férussac) levou a redução nas suas reservas de carboidratos em aproximadamente 70%. No entanto, sabe-se que os moluscos terrestres exibem adaptações que garantem a manutenção das reservas durante o período de jejum prolongado, onde a proteína muscular é degradada em aminoácidos para síntese das proteínas essenciais, e em cetoácidos, para a gliconeogênese, visando à manutenção das concentrações sanguíneas de glicose (Baynes & Dominiczak 2000), o que poderia ter contribuído para o aumento dos níveis de carboidratos em *P. lineata* em estivação.

O aumento nos níveis de ácido úrico, bem como nos níveis de carboidratos totais elevam a osmolaridade dos fluidos corporais caracterizando outra estratégia fisiológica para reduzir a perda de água durante o período de estivação. Assim, esses eventos podem ter contribuído para proteger e/ou impedir a degradação gonadal, visto que foram observados apenas uma involução nas gônadas de ambos os sexos, o que pode ser devido a um estado de quiescência em decorrência do processo meiótico se tornar mais lento nos períodos de estivação promovendo alterações histológicas (Furtado; Bessa; Castanon 2002; Delgado; Camacho 2005). Dessa forma, concluiu-se que em *P. lineata* a metabolização de proteínas é proporcional ao período de estivação, para síntese de carboidratos e excreção de ácido úrico, garantindo assim, a integridade do aparelho reprodutor e da gametogênese.

5. Referências

- Baynes J, Dominiczak MH, 2000. Bioquímica médica. Editora Manole, Cap.18;28, pág. 218; 260, 1ed. São Paulo.
- Becker BF, 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biology and Medicine*. 14: 615–631.
- Bhattacharyya KN, Chaki KK, Sarkar AK, Misra KK, 2012. Ultrastructure of the Salivary Gland Cells in Active and Aestivated Mollusk, *Pila globosa* (Gastropoda: Orthogastropoda: Ampularidae). *Proceedings of the Zoological Society*. June 65: Issue 1, 64-69.
- Bishop SH, Ellis LL, Burcham JM, 1983. Amino acid metabolism in molluscs. In - *The Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*. Academic Press, New York, USA. 1: 243-327.

- Coler RA, Coler RR, Felizardo EG, 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.
- Cook A, 2001. 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: 447–487.
- Da Silva SM, Zancan DM, 1994. Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod *Megulobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A:337-341.
- Delgado M, Camacho AP, 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussates* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Scientia Marina*, 69: n. 1 87-97.
- Fellerhoff C, 2002. Feeding and growth of apple snail *Pomacea lineata* in the Pantanal wetland, Brazil—a stable isotope approach. *Isotopes Environ Health Stud.* 38(4): 227-43.
- Fellerhoff C, 2002. Feeding and Growth of Apple Snail *Pomacea lineata* in the Pantanal Wetland, Brazil—a Stable Isotope Approach. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 38: n. 4 227-243.
- Giraud-Billoud M, Abud MA, Cueto JA, Veja IA, Castro-Vazquez A, 2011. Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 158: 506–512.
- Guppy M, Withers P, 1999. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Biological Reviews of the Cambridge. Soc.* v.74, 1–40.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T, 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 133: 537-556.

- Hermes-Lima M, Ramos-Vasconcelos GR, Cardoso LA, Orr AL, Rivera PM, Drew KL, 2004. Animal adaptability to oxidative stress: gastropod estivation and mammalian hibernation. In: *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application (Twelfth International Hibernation Symposium)*, (eds. B. M. Barnes and V. M. Carey), Fairbanks:University of Alaska Fairbanks. 585-593.
- Hodasi JKM, 1979. Life story studies of *Achatina (Achatina) achatina* (Linné). *Journal of Molluscan Studies*, Londres, 45: 328-339.
- Hodasi JKM, 1982. The effects of different light regimes on the behaviour and biology of *Achatina (Achatina) achatina* (Linné). *Journal of Molluscan Studies*, Londres, 48: 283-293.
- Ip YK, Chew SF, 2010. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Front. Physio.* 1:134-154.
- Jahan S, Islam R, Rahman R, Alam MM, 2007. Induced Breeding of *Pila globosa* (Swainson 1822) (Gastropoda: Prosobranchia) for Commercial Farming. *Univ. j. zool. Rajshahi Univ.* 26: 35-39.
- Kenneth BS, 2001. Turning down the fires of life: Metabolic regulation of Hibernation and aestivation Bios Scientific publishers, Oxford, 1-21.
- Laurentini A, Edwards CAA, 2003. microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Anal. Biochem.*, 315: 413-415.
- Lira CRS, Gomes EM, Chagas GM, Pinheiro, 2000. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac) (Mollusca, Gastropoda, Xanthonychidae). *Revista Brasileira de Zoologia.* 17 (4): 907-913.
- Lum-Kong A, Kenny JS, 1989. The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). *J Mollus Stud* 55: 53-65.

Matsuzawa Y, Keno Y, Matsuzawa K, Tokunaga S, Fujioka T, Kawamoto T, Kobatake S, 1991. High sucrose diet increases visceral fat accumulation in VMH-lesioned obese rats. *Int. J. Obesity* 15: 205–211.

Moreno-Rueda G, 2008. 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.* 6, p.43-51.

Rossi IC, Da Silva SM, 1993. Effects of starvation and a carbohydrate rich diet on glycogen metabolism in a gastropod mollusc, *Megulobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:831-836.

Smolders R, Baillieul M, Blust R, 2005. Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 73 (2): 155-170.

Storey KB, Storey JM, 2011. Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation. *Res. Rep. Biol.* 2: 57–68.

Storey KB, Storey JM, 2012. Aestivation: signalling and hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 215: 1425-1433.

Storey KB, 2002. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Series A*, 134: 733–754.

Whitman RE, Storey KB, 1990. Pyruvate kinase from the land snail *Otala Lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. *J. Exp. Biol.* 154: 321-337.

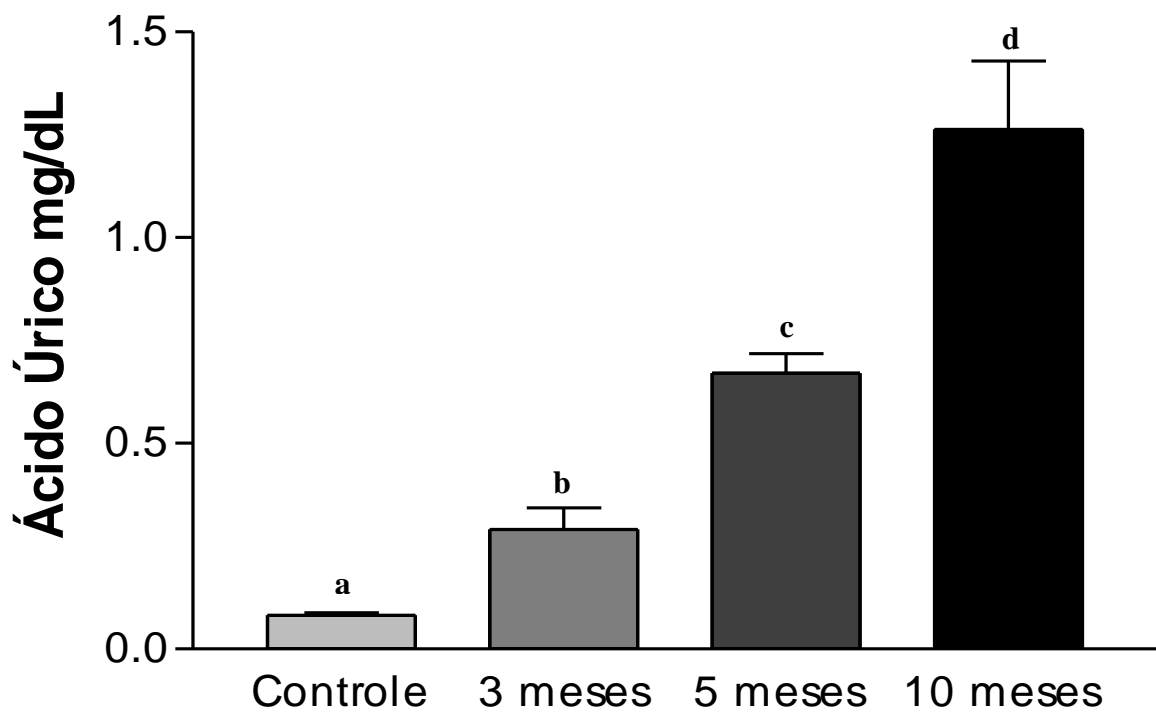


Figura 1: Concentrações médias de ácido úrico (mg/dL) na hemolinfa *P. lineata*. $F = 88,10$. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t-student ($p < 0,05$).

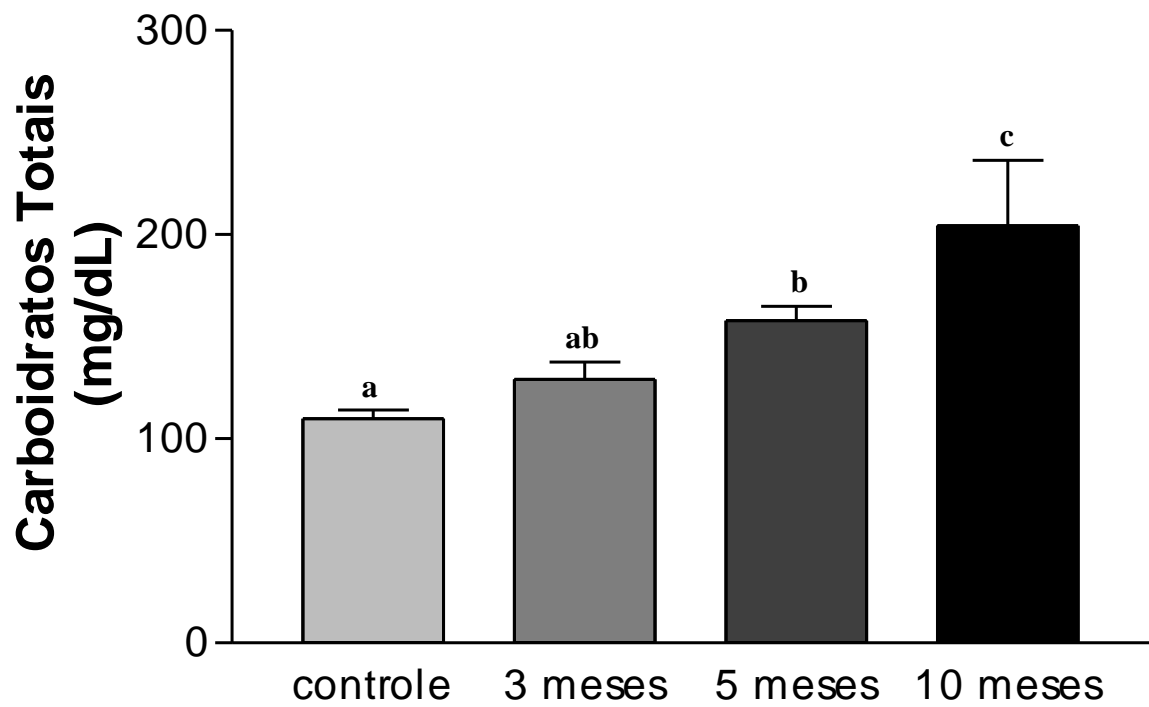


Figura 2: Concentrações médias de carboidratos totais (mg/dL) na hemolinfa de *P. lineata*. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste t-student ($p < 0,05$).

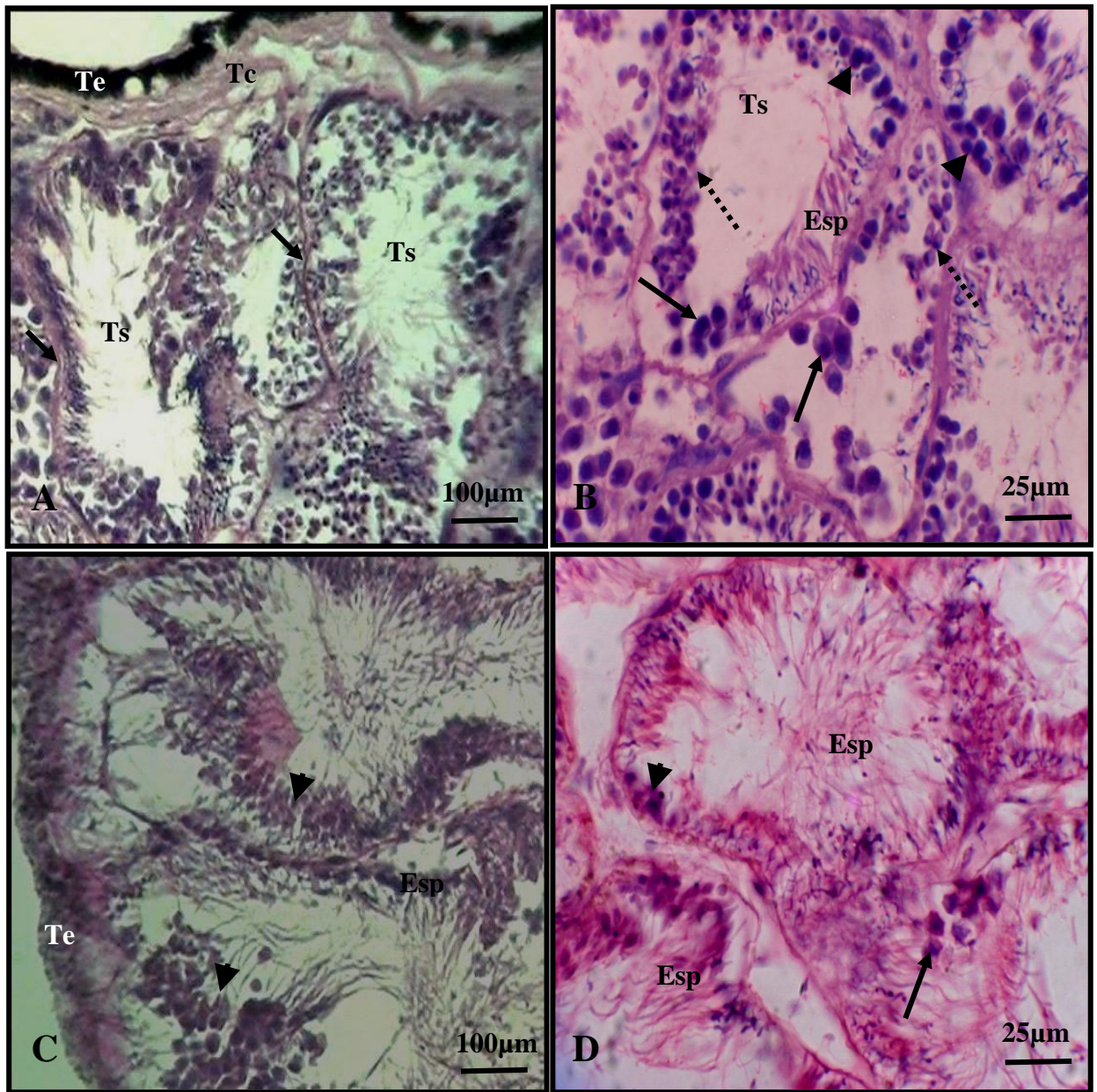


Figura 3: Testículo de *P. lineata* dos grupos controle (A e B) e estivantes (C e D). Te – Tecido epitelial, Ts – Túbulo seminífero, Seta curta – Septo de tecido conjuntivo, Ponta de seta – Espermatogônias, Seta longa – Espermatócitos, Seta tracejada – Espermatídes, Esp – Espermatozóides. Coloração H.E.

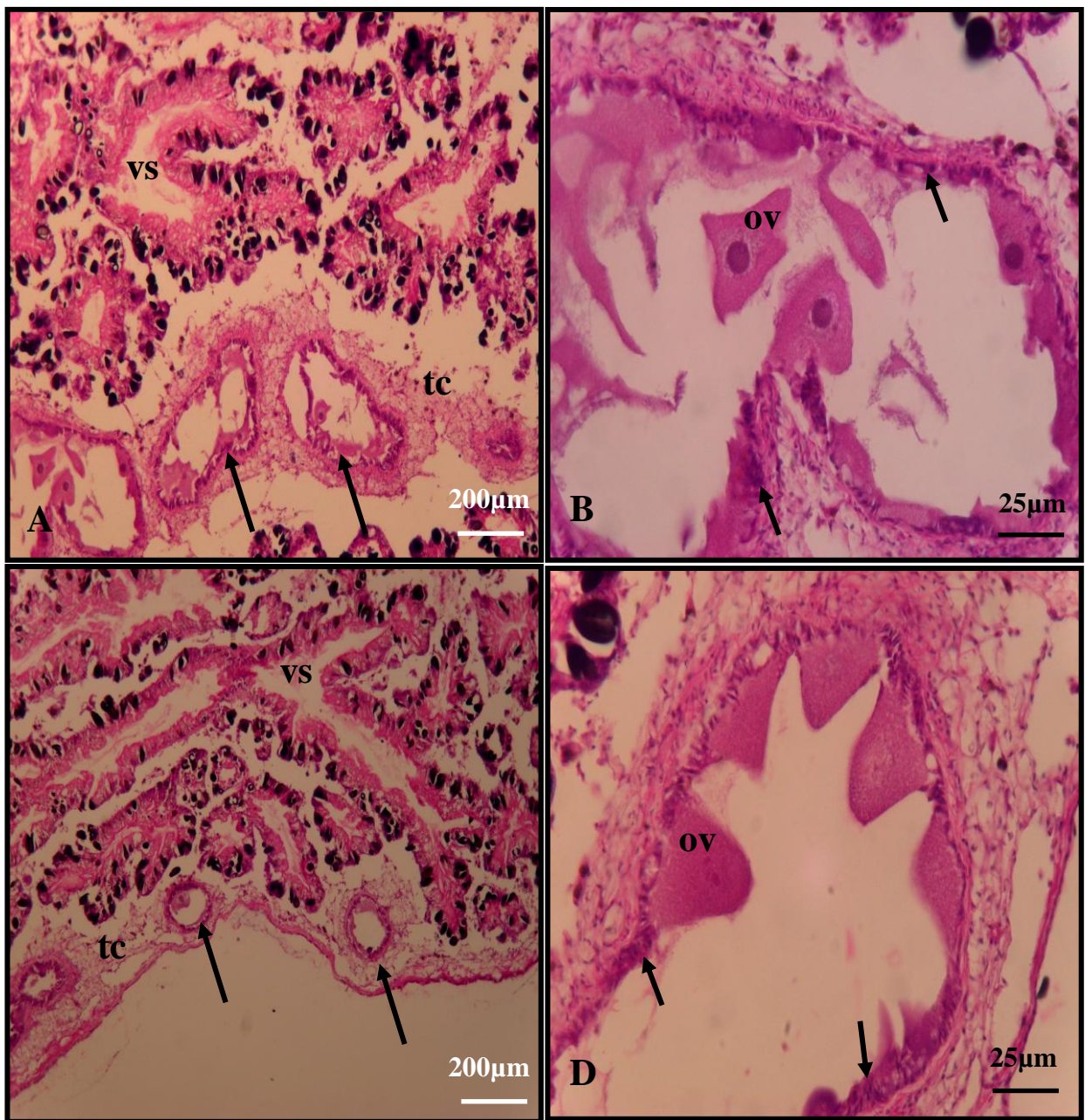


Figura 4: Ovário de *P. lineata* dos grupos controle (A e B) e estivantes (C e D). vs – Vesícula seminal, tc – Tecido conjuntivo, Seta longa – Folículos ovarianos, Seta curta – Ovogônias, ov – Ovócitos. Coloração H.E.