



## Influência do jejum intenso durante 30 dias na hematopoiese de *Bradybaena similaris* (Mollusca, Xanthonychidae)

Marcelo Stravalli Correa<sup>1</sup> & Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bacharel em Biologia Animal pela UFRRRJ; <sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

**Abstract.** Specimens of *Bradybaena similaris* with 13 – 15 mm shell diameter had been kept under experimental conditions for this study aimed to investigate the influence of intense fasting, changes in temperature and relative humidity on the total number of hemocytes/ml hemolymph, for a period of 30 days. For this purpose, we performed a cardiac puncture to obtain hemolymph of the control group and those undergoing intense fasting at regular intervals. The most significant differences in the number of hemocytes were observed on the 10th day, when the snails kept in fasting has tripled the production of hemocytes when compared to the control group and 15 ° and 25 ° day when the snails submitted to fasting presented a marked reduction in number of hemocytes in the control group. In part the increase in temperature coincides with the largest number of haemocytes in snails kept in fasting. The relative humidity was higher in 5 °, 25 ° and 30 ° day of the experiment, coinciding with the increase in production the hemocytes both in the control group as for those kept under fasting in different periods of the experiment. Although the statistical analysis by Student's t test has shown that variations in temperature and relative humidity did not influence significantly the total number of hemocytes in snails of the two groups. The regression test analysis 4th order polynomial showed a greater relationship between the duration of the experiment and the total number of hemocytes produced by snails in the control group. The snails were subjected to intense fasting, had stowed almost the entire experimental period. This behavior can be considered as a compensatory mechanism to maintain homeostasis in response to the stress of food shortage.

**Keywords:** *Bradybaena similaris*, stress, temperature, humidity, intense fasting and hemocytes.

**Resumo.** Espécimes de *Bradybaena similaris* com diâmetro de concha variando entre 13 e 15 mm foram mantidos sob condições experimentais para a realização deste estudo que teve por objetivo verificar a influência do jejum intenso, da variação de temperatura e umidade relativa do ar sobre o número de hemócitos totais/ml de hemolinfa de *B. similaris*, por um período de 30 dias. Para tanto, foi realizada a punção cardíaca para obtenção de hemolinfa em moluscos do grupo controle e naqueles submetidos ao jejum intenso em intervalos regulares. As diferenças mais expressivas no número de hemócitos foram verificadas no 10° dia, quando os moluscos mantidos em jejum triplicaram a produção de hemócitos quando comparados ao grupo controle e no 15° e 25° dias quando os moluscos submetidos ao jejum apresentaram uma redução acentuada no número de hemócitos em relação ao grupo controle. Em parte o aumento da temperatura coincide com o maior número de hemócitos nos moluscos mantidos em jejum. A umidade relativa do ar foi maior no 5°, 25° e 30° dias de experimento, coincidindo com o aumento na produção de hemócitos tanto pelos moluscos do grupo controle quanto por aqueles mantidos sob jejum, em períodos distintos do experimento. Embora, a análise estatística pelo teste t de Student tenha demonstrado que as variações de temperatura e umidade relativa do ar não influenciaram significativamente no número de hemócitos totais produzidos pelos moluscos dos dois grupos estudados. A análise

pelo teste de regressão polinomial de 4ª ordem evidenciou maior relação entre a duração do experimento e o número de hemócitos totais produzidos pelos moluscos do grupo controle. Os moluscos submetidos ao jejum intenso estiveram durante quase todo o período experimental. Este comportamento pode ser considerado como um mecanismo compensatório para a manutenção da homeostase, em resposta ao estresse de carência alimentar.

**Palavras-chave:** *Bradybaena similaris*, estresse, temperatura, umidade, jejum intenso e hemócitos.

### INTRODUÇÃO

Os gastrópodes pulmonados terrestres são conhecidos por sua importância econômica e médico-veterinária. Várias espécies são comestíveis e, amplamente comercializadas, enquanto outras são pragas agrícolas de diversas culturas e/ou participam de ciclos biológicos de parasitos. Neste sentido, *Bradybaena similaris* (FÉRUSAC, 1821) é muito utilizada em estudos experimentais, por ser uma das espécies mais comuns no Brasil, apresentar manejo simplificado, alta taxa reprodutiva e fácil adaptação às condições experimentais, além de atuar como hospedeiro intermediário de trematódeos digenéticos, entre outros helmintos (ARAÚJO, 1989; PASCHOAL & AMATO, 1993; 1996; BRANDOLINI & AMATO, 2001).

Entre os fatores ambientais que mais interferem na biologia dos moluscos pulmonados estão temperatura e umidade. Embora, os moluscos apresentem uma faixa de tolerância para esses parâmetros, variações acentuadas de temperatura e umidade podem afetar o crescimento, a sobrevivência e o comportamento desses animais. Diferentes estratégias fisiológicas e comportamentais, envolvendo

estivação, retração da massa cefalopodal e enterramento garantem a sobrevivência dos moluscos durante períodos desfavoráveis (LEAHY, 1980; D'ÁVILA *et al.*, 2004).

Estudos de fisiologia comparada dos moluscos demonstraram que as alterações que ocorrem em moluscos infectados por trematódeos digenéticos são semelhantes às respostas apresentadas pelos moluscos durante períodos de estivação (PINHEIRO, 1996; PINHEIRO *et al.*, 2001).

Sistema interno de defesa (IDS) de caramujos é composto de elementos celulares, designados hemócitos, e por fatores solúveis presentes na hemolinfa (VAN DER KNAAP & LOKER, 1990). Por constituir um sistema semi-aberto, os hemócitos podem circular na hemolinfa ou estarem fixos nos tecidos do molusco. Os hemócitos são essenciais no reconhecimento e destruição dos organismos invasores. Segundo BAYNE (1983), esta denominação é mais apropriada do que "sistema imune", porque os linfócitos, as imunoglobulinas e as respostas anamnéticas ao antígeno específico não ocorrem nos moluscos.

Este estudo teve por objetivo verificar a influência do jejum intenso, da variação de temperatura e umidade relativa do ar sobre o número de hemócitos totais/ml de hemolinfa de *B. similaris*, por um período de 30 dias.

O conhecimento da influência do jejum intenso sobre o número de hemócitos totais circulantes na hemolinfa de *B. similaris* possibilitará um maior entendimento sobre os mecanismos de resposta deste molusco frente a condições de estresse, subsidiando estudos futuros envolvendo infecções experimentais com trematódeos digenéticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram estabelecidos dois grupos distintos de moluscos: o grupo controle e o grupo experimental, sendo este último composto por diferentes períodos de jejum intenso, conforme Tabela 1. Cada um desses grupos era composto por 70 moluscos com diâmetro de concha variando entre 13 e 15 mm.

**Tabela 1:** Períodos de jejum intenso (dias) a que os espécimes de *Bradybaena similis* (concha com 13 a 15 mm de diâmetro) foram expostos durante a realização do experimento.

Grupos de jejum intenso	Período (dias)
I	00*
II	05
III	10
IV	15
V	20
VI	25
VII	30

\* Início do experimento.

A manutenção dos moluscos do grupo controle foi feita em dias alternados, envolvendo a limpeza dos terrários, manutenção da umidade com água desclorada e a renovação do alimento. Por serem polifitófagos, os moluscos aceitaram bem a dieta constituída de: alface, repolho, cenoura e pepino. Uma suplementação de cálcio foi oferecida durante o período experimental. A manutenção dos moluscos do grupo experimental foi feita da mesma maneira que a do grupo controle com exceção para os alimentos e suplementação de cálcio que não eram oferecidos a estes moluscos.

As variações de umidade relativa do ar e das temperaturas, máxima e mínima, no interior do laboratório foram registradas diariamente durante todo o experimento.

A coleta de hemolinfa foi realizada em 23 moluscos do grupo controle e em 25 do grupo experimental, em intervalos de 5 dias durante 30 dias. Os moluscos eram lavados com solução fisiológica 0,65%, secos com gaze e colocados em placas de Petri. Sendo, posteriormente, observados ao estereomicroscópio, para a localização da cavidade pericárdica. Um pequeno orifício foi feito na concha na altura da cavidade pericárdica, utilizando-se seringa hipodérmica e agulha estéril. Com outra seringa, igualmente estéril, procedeu-se a punção da amostra de hemolinfa.

A análise quantitativa dos hemócitos foi realizada em amostras de hemolinfa diluídas em 10%, com solução salina fisiológica 0,65% em câmara de Neubauer. A contagem dos hemócitos totais foi realizada com auxílio de Microscópio de luz Olympus CH30, sendo determinado o número de hemócitos totais/ml de hemolinfa.

A análise estatística das variações de umidade relativa do ar; temperaturas, máxima e mínima e do número de hemócitos totais/ml de hemolinfa no grupo controle e naquele submetido ao jejum intenso, foi realizada pelo Programa Graph Pad Instat, utilizando-se o teste t de Student.

A análise estatística da influência dos diferentes períodos de jejum intenso sobre o número de hemócitos totais/ml de hemolinfa de *B. similis* foi realizada com o programa Graph Pad Prism, utilizando-se o teste de regressão não-linear polinomial de 4ª ordem.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A periodicidade na manutenção dos terrários propiciou um ambiente favorável aos moluscos do grupo controle. Os alimentos oferecidos eram variados e distribuídos homogêaneamente nos terrários, evitando assim gasto maior de energia devido à procura pelos mesmos. Segundo FRANTZ & MOSSMANN (1989) quando os caracóis encontram alimento em lugar de fácil acesso, renunciam a procura de outro que possa significar maior gasto energético.

Dentre os alimentos oferecidos, o consumo pelos moluscos em ordem de preferência foi de pepino, cenoura e repolho. De acordo com SANTOS (1982) os moluscos preferem os alimentos mais tenros, com maior quantidade de água. O suplemento de cálcio foi consumido esporadicamente.

A manutenção dos terrários dos moluscos submetidos ao jejum severo envolveu apenas o fornecimento de água através de um pulverizador, o que evitou que os moluscos tivessem estresse hídrico.

Durante a realização do experimento, os moluscos do grupo controle apresentaram comportamento considerado normal, não sendo observadas alterações que pudessem ser relacionadas às condições experimentais. Os moluscos submetidos ao jejum intenso, embora estivessem sob as mesmas condições de temperatura e umidade que os moluscos do grupo controle, apresentaram comportamento diferenciado. Após o 5º dia de jejum, esses moluscos iniciaram um processo de estivação, apresentando-se ativos, apenas, durante a manutenção do terrário.

Espécies de moluscos terrestres apresentam diferentes estratégias para minimizar os efeitos de condições ambientais desfavoráveis. Durante o

período de estivação, os moluscos evitam o gasto excessivo de energia e a perda de água. Este comportamento pode ser considerado como um mecanismo compensatório para a manutenção da homeostase, em resposta ao estresse de carência alimentar a que estes moluscos foram expostos, no presente estudo. Visto que os moluscos do grupo controle não estivaram. Em condições favoráveis de temperatura e umidade os moluscos apresentam um aumento da atividade de locomoção o que impõe maior consumo de alimentos (DIAS *et al.*, 2007). Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, indicando que a ausência de alimentação foi o fator que desencadeou o processo de estivação no grupo de moluscos mantidos sob jejum intenso.

Dos 70 moluscos, que formavam o grupo controle, 12 morreram, representando 17,14% de mortalidade ao final do experimento. Entre os 70 moluscos, que foram submetidos ao jejum intenso, 15 morreram, totalizando 21,43% de mortalidade para este grupo de moluscos. A análise estatística demonstrou que estes resultados não diferem significativamente entre si. Segundo LEAHY (1980), *B. similis* apresenta grande resistência quando exposta a condições adversas, como jejum e dessecação. Para MEAD (1979), as espécies consideradas pragas podem ser coletadas facilmente em grandes quantidades, e mantidas satisfatoriamente sob uma gama extensiva de condições laboratoriais, aceitando uma ampla lista de itens alimentares ou, nenhum alimento durante semanas ou meses.

De acordo com a Tabela 2, ao final do experimento, a temperatura máxima apresentou uma variação entre 30,4 e 34,0°C, a temperatura mínima de 28,2 a 31,4°C e a umidade relativa do ar de 59,0 a 85,0%.

Estes valores estão fora da faixa de tolerância estabelecida por Leahy (1980) para *B. similaris*. Segundo este autor, as condições consideradas ótimas para a atividade desse molusco seriam de 80% de umidade relativa do ar e temperatura variando entre 23 e 25°C. A análise estatística da variação de temperatura, máxima e mínima, no laboratório durante a realização do experimento, pelo teste t de Student não evidenciou variação significativa.

Segundo LEAHY (1980) algumas espécies de gastrópodes terrestres podem apresentar grande resistência em condições de baixa umidade. Este autor verificou que *B. similaris* sobrevive por um período de 24 dias quando submetida ao jejum e a dessecação. No presente estudo, os moluscos sobreviveram por um período superior a 30 dias. Embora, para este delineamento experimental as observações tenham sido encerradas no 30º dia de jejum intenso.

De acordo com D'ÁVILA *et al.* (2004), *B. similaris* é mais resistente à dessecação do que outras espécies terrestres. Para estes autores, a maior resistência observada para *B. similaris* se deve à produção do epifragma, que é uma estrutura produzida pelo animal para fechar a abertura da concha, evitando a perda de água por evaporação.

A variação de umidade relativa do ar foi maior do início ao 5º dia de experimento e entre o 25º e 30º dias de experimento, coincidindo com um aumento na produção de hemócitos tanto pelos moluscos do grupo controle quanto por aqueles mantidos em jejum intenso, em períodos distintos do experimento. Entretanto, quando se compara o número de hemócitos totais do grupo controle e do grupo submetido ao jejum severo, nestes períodos não são observadas diferenças significativa.

**Tabela 2:** Variações médias das temperaturas, máxima e mínima, e da umidade relativa do ar, no laboratório, durante o período experimental. Sendo X a média e SD o desvio padrão.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)		Umidade relativa (%) X±SD
	Máxima X±SD	Mínima X±SD	
00	33,0*	31,0*	64,0*
05	30,4 ± 1,517	28,2 ± 1,095	70,2 ± 6,760
10	33,4 ± 1,342	30,4 ± 1,000	72,4 ± 3,362
15	32,6 ± 0,894	28,6 ± 1,342	72,6 ± 8,792
20	33,4 ± 3,286	31,4 ± 3,435	69,8 ± 8,167
25	30,4 ± 1,140	28,8 ± 0,837	75,6 ± 4,827
30	34,0 ± 0,707	31,2 ± 1,304	68,0 ± 3,317
Média final ± SD	32,5 ± 1,468a	30,0 ± 1,416a	71,2 ± 6,123
Valor máximo	34,0	31,4	85,0
Valor mínimo	30,4	28,2	59,0

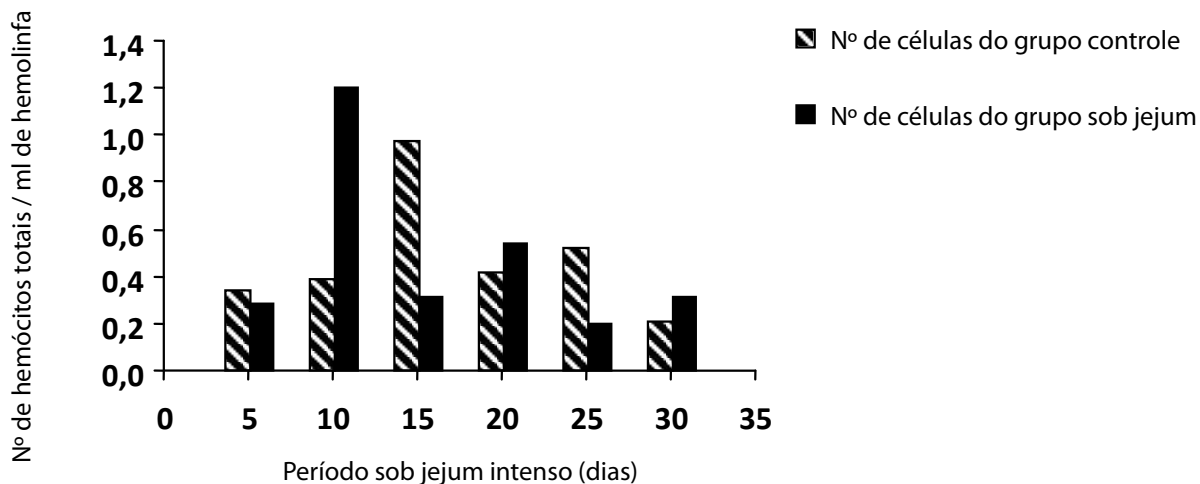
\* A ausência de desvio padrão se deve ao fato de que os valores foram registrados no momento da instalação do experimento, não representando variações no intervalo de cinco dias como ocorreu para os demais períodos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

A identificação da cavidade pericárdica de *B. similis* sob estereomicroscópio foi facilitada pela espessura e coloração da concha do molusco e também pela utilização de um pincel úmido na limpeza externa. Favorecendo, então, a utilização da técnica de obtenção de hemolinfa através da punção cardíaca, como descrito por ADEMA *et al.* (1992).

Os hemócitos dispersos na solução fisiológica 0,65% permaneciam indiferenciados, não expandidos, com núcleo íntegro, morfologia estável e o citoplasma distribuído de forma regular em torno do núcleo. As características morfológicas foram preservadas durante todo o período da análise, cerca de 40 minutos, possibilitando a contagem dos hemócitos totais na câmara de Neubauer. Conforme, SMINIA (1981), o número de hemócitos totais circulantes na hemolinfa de diferentes espécies de gastrópodes já foi estabelecido por vários autores.

Contudo, esse número pode variar de espécie para espécie e dentro da mesma espécie, de acordo com a técnica utilizada, o local escolhido para a extração da hemolinfa e também devido às condições fisiológicas individuais dos moluscos.

Conforme pode ser observado na Figura 1, as diferenças mais expressivas na produção de hemócitos foram verificadas no 10º dia, quando os moluscos mantidos em jejum intenso triplicaram a produção de hemócitos quando comparados aqueles do grupo controle. Contrariamente, no 15º e 25º dias, os moluscos submetidos ao jejum intenso apresentaram uma redução correspondente a pouco mais que a metade do número de hemócitos apresentado pelos moluscos do grupo controle. Nos demais períodos do experimento, as diferenças observadas foram pouco expressivas.



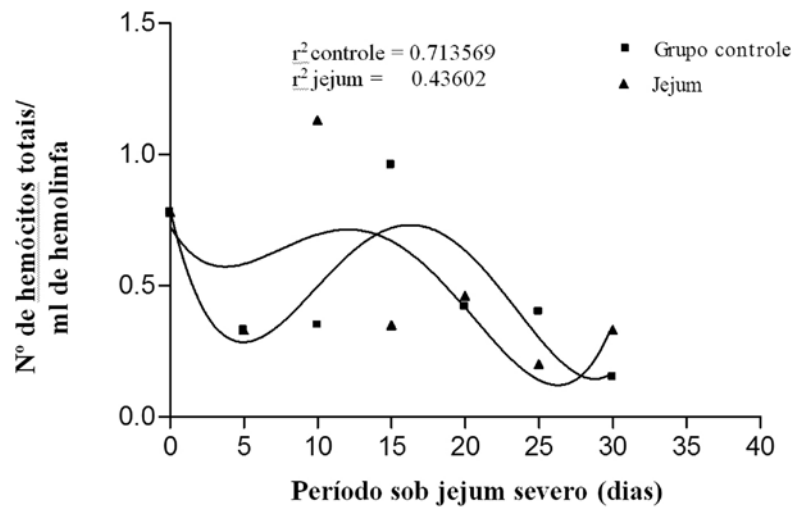
**Figura 1.** Variação do número de hemócitos totais  $\times 10^5/\text{ml}$  de hemolinfa de *Bradybaena similis* submetida a diferentes períodos de jejum intenso. Contagem feita em câmara de Neubauer. (Teste t de Student com programa Graph Pad Instat).

No período de 5 a 10 dias de experimento foi registrada uma variação de 3°C na temperatura máxima (Tab. 2). Esta variação pode ter contribuído para a maior produção de hemócitos pelos moluscos mantidos sob jejum intenso. Visto que neste período, o número de hemócitos totais/ml de hemolinfa dos moluscos grupo controle variou muito pouco e para os moluscos mantidos em jejum intenso foi observado um aumento superior ao triplo no seu número celular, a maior taxa verificada durante todo o experimento (Fig. 1). Estes resultados estão de acordo com estudos de fisiologia comparada dos moluscos realizados por PINHEIRO (1996) e PINHEIRO *et al.* (2001). Segundo estes autores, as alterações que ocorrem em moluscos infectados por trematódeos digenéticos são semelhantes às respostas apresentadas pelos moluscos durante períodos de estivação. As infecções por trematódeos digenéticos representam uma demanda energética muito grande para o molusco hospedeiro. Especialmente no início da infecção quando ocorre intenso processo de reprodução assexuada para a formação dos

esporocistos de primeira e segunda geração. O que para a maioria das espécies de trematódeos digenéticos ocorre entre 10 e 30 dias após a infecção. Corroborando com a proposta deste estudo que foi oferecer subsídios para estudos futuros envolvendo infecções experimentais de *B. similaris* com trematódeos digenéticos. Sendo esta a razão para o experimento ter a duração de 30 dias.

Embora, a análise estatística pelo teste t de Student não tenha evidenciado diferença significativa, ao final do experimento, para o número de hemócitos totais dos moluscos do grupo controle e daqueles mantidos sob jejum intenso, foram observadas algumas diferenças para mais ou para menos no número de hemócitos/ml de hemolinfa dos moluscos submetidos ao jejum intenso e daqueles do grupo controle.

A análise estatística pelo teste de regressão polinomial de 4ª ordem indicou uma relação maior entre o tempo (dias) de duração do experimento e o número de hemócitos totais dos moluscos do grupo controle, como pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Relação entre o tempo (dias) e o número de hemócitos  $\times 10^5/\text{ml}$  de hemolinfa de *Bradybaena similaris* do grupo controle e do grupo submetido ao jejum intenso. (Teste de regressão não-linear polinomial de 4ª ordem com o programa Graph Pad Prism).

## CONCLUSÃO

Este estudo teve como proposta oferecer subsídios para estudos futuros envolvendo infecções experimentais de *B. similaris* com trematódeos digenéticos. O que pode ser confirmado pelos resultados obtidos. O estresse imposto pelo jejum intenso determinou respostas mais expressivas na produção de hemócitos em período que coincide com a formação dos esporocistos de primeira e segunda geração dos trematódeos digenéticos. O que para a maioria das espécies de trematódeos digenéticos ocorre entre 10 e 30 dias após a infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMA, C. M.; R. A. HARRIS & E. C. VAN DEUTEKOM-MULDER. 1992. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. **Journal of Invertebrate Pathology**, **59**: 24-32.
- ARAÚJO, J. L. B. 1989. Moluscos de importância econômica no Brasil. I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821). (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, **6**(4): 583-592.
- BAYNE, C. J. 1983. Molluscan immunobiology In: **The Mollusca**. Vol. 5. Physiology, part 2. (Saleuddin, A. S. M & K. M. Wilbur, eds). New York. Academic Press, Inc., pp. 408-486.
- BRANDOLINI, S. V. P. & S. B. AMATO. 2001. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **18**(2): 499-510.
- D'ÁVILA, S., R. J. P. DIAS, E. C. A. BESSA & E. DAEMON. 2004. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, **6**(1): 115-127.
- DIAS R. J. P., E. C. A. BESSA. & S. DÁVILA. 2007. Influence of substrate humidity on desiccation resistance capacity in *Subulina octona* (Mollusca, Subulinidae). **Brasilian Archives of Biology and Technology**, **50**(1): 137-140.
- FRANTZ, M. A & R. L. MOSSMANN. 1989. Alimentação de *Helix aspersa* Muller (Gastropoda, Helicidae) em cativeiro. **Acta Biológica Leopoldensia**, **11**: 227-233.
- KNAAP, W. P. W. VAN DER & E. S. LOKER. 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitology Today** **6**:175-182.
- LEAHY, W. 1980. Aspectos adaptativos de *Bradybaena similaris* Ferussac, 1821 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) submetido ao jejum e dessecação. **Boletim de Fisiologia Animal**, **5**: 47-55.
- MEAD, A. R. 1979. **Pulmonates. Vol. 2B. Economic malacology, with particular reference to *Achatina fulica***. London: Academic Press. 150 p.
- PASCHOAL, S. V. & S. B. AMATO. 1993. Consumo de oxigênio e reserva glicolítica em *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda, Xanthonychidae) infectada com *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet, 1892) (Digenea, Dicrocoeliidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **2**: 115-118.
- PASCHOAL, S. V. & S. B. AMATO. 1996. *Eurytrema coelomaticum* (Giard et Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): alterações nos depósitos de cálcio e na função reprodutiva do primeiro hospedeiro intermediário. **Revista Brasileira de Zoologia**, **13**: 411-418.



- PINHEIRO, J. 1996. Influence of starvation on the glycogen and galactogen contents in the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, **39**: 349–357.
- PINHEIRO, J.; E. M. GOMES & G. M. CHAGAS. 2001. Aminotransferases activity in the hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under starvation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 1161-1164.
- SANTOS, E. 1982. **Moluscos do Brasil** (vida e costumes) Belo Horizonte: Itatiaia Ltda. 141p.
- SMINIA, T. 1981. Gastropods. *In*: **Invertebrate blood cells**. **Vol. 2** (N. A. Ratcliffe and A. Rowley, eds.). New York: Academic Press, Pp. 191-232.

**Recebido: 20/04/2010**

**Revisado: 03/05/2012**

**Aceito: 03/05/2012**

