



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS HEMÓCITOS CIRCULANTES E ANÁLISE
BIOQUÍMICA DA HEMOLINHA DO CARAMUJO GIGANTE AFRICANO,
Achatina fulica.

Elaborado por
GISELI CRISTINA DA COSTA ARRUDA

Orientadora
SOLANGE VIANA PASCHOAL BLANCO BRANDOLINI

Co-orientador
JAIRO PINHEIRO DE SILVA

SEROPÉDICA, 2018

GISELI CRISTINA DA COSTA ARRUDA
SOLANGE VIANA PASCHOAL BLANCO BRANDOLINI
JAIRO PINHEIRO DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS HEMÓCITOS CIRCULANTES E ANÁLISE
BIOQUÍMICA DA HEMOLINFA DO CARAMUJO GIGANTE AFRICANO,
Achatina fulica.

Monografia apresentada como
requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas do Instituto de Ciências
Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro.

SEROPÉDICA, 2018

IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS HEMÓCITOS CIRCULANTES E ANÁLISE
BIOQUÍMICA DA HEMOLINFA DO CARAMUJO GIGANTE AFRICANO,
Achatina fulica.

GISELI CRISTINA DA COSTA ARRUDA

MONOGRAFIA APROVADA EM: 22/01/2018

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE: Solange S. Paschoal B. Brandolini
Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, DBA/ICBS/UFRRJ

MEMBRO TITULAR: Patrícia Fampa Negreiros Lima
Dra. Patrícia Fampa Negreiros Lima, DCFar/ICBS/UFRRJ

MEMBRO TITULAR: [Assinatura]
Dr. Bruno Pereira Berto, DBA/ICBS/UFRRJ

MEMBRO SUPLENTE: Jairo Pinheiro da Silva
Dr. Jairo Pinheiro da Silva, DCFis/ICBS/UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus** por ter conduzido todos os passos da minha vida, por ter me dado força e coragem para seguir este longo, porém gratificante caminho.

Agradeço a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe Janete, por sempre ter lutado por mim. Obrigada por todo esforço, dedicação e investimentos financeiro, espiritual e afetivo. Obrigada por sempre cuidar de mim e ser exemplo de mulher virtuosa e vencedora.

Gostaria de dizer muito obrigada pelo apoio de toda minha família, os que de perto ou de longe sempre torceram pelo meu sucesso, em especial, meu irmão Marcus Vinícius. Meu amor por você é infinito! (*blood is thicker!*)

A big thank you to my love Peter, for his patience, support and love even so many kilometers away. I love you with all my heart. (he wait has ended.)

Aos amigos que adquiri ao longo da vida, ao longo da jornada ruralina, aos que me ajudaram na pesquisa direto ou indiretamente, aos amigos do CsF e aos que fizeram parte da melhor turma de Ciências Biológicas da UFRRJ, a 2011-2. Obrigada de coração!

À minha orientadora, querida professora Solange, vai um agradecimento muito especial por seu carinho, paciência e prazer ao ensinar. Obrigada por ter me ajudado a chegar até aqui, por me mostrar este lindo caminho da malacologia, e por ser um grande exemplo de mulher na pesquisa! Estará sempre no meu coração!

Ao professor Jairo, obrigada com muito carinho por sua ajuda na pesquisa, ensinamentos e seu apoio com a bolsa de Iniciação Científica.

Aos professores e funcionários da UFRRJ, que contribuíram imensamente com minha vitória de hoje. Em especial, ao professor Bruno Berto por vezes ter cedido seu laboratório quando precisei e à professora Patrícia Fampa pelos conselhos e carinho.

Gratidão para com a *CAPES*, *PIBIC*, *CNPQ*, ao programa *Ciência sem Fronteiras*, à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ), e à minha saudosa Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Dedicado à minha vovó Alaíde (*in memoriam*),
quem me apoiou sem nunca duvidar.
Por ter sido sempre um referencial de amor e perseverança.
Te amo incondicionalmente.

RESUMO

Achatina fulica Bowdich, 1822, molusco pulmonado terrestre, conhecido como caramujo gigante africano, originário da África, que ao ser introduzido no Brasil apresentou uma extraordinária adaptação e dispersão, principalmente devido ao seu hábito generalista, alta resistência às variáveis ambientais e ao elevado potencial reprodutivo. As invasões biológicas são consideradas a segunda causa de perda da biodiversidade, pois podem alterar os ciclos ecológicos. Neste sentido, *A. fulica* tem sido considerada uma praga em potencial em agriculturas, jardins e matas nativas, podendo atuar também como hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935, nematóide causador de meningoencefalite em pessoas, e de *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971, que pode causar angiostrongilose abdominal, ambos com registro no Brasil. De forma a possibilitar um maior conhecimento sobre aspectos relacionados à resistência apresentada por este molusco invasor e fornecer subsídios para estudos futuros de correlação entre o sistema de defesa interno do molusco e sua comprovada capacidade adaptativa e como hospedeiro de parasitos com grande relevância para a saúde pública, desta forma este estudo teve por objetivo caracterizar e descrever os hemócitos circulantes na hemolinfa deste molusco, como também realizar a análise bioquímica de sua hemolinfa. Para o estabelecimento da colônia de moluscos no laboratório, foram realizadas coletas em áreas residenciais de três bairros da cidade do Rio de Janeiro, em diferentes períodos, nos anos de 2016 e 2017. No laboratório, os caracóis foram alocados em terrários de vidro e plástico, forrados com uma camada de terra esterilizada em estufa e receberam etiquetas contendo o local e data da coleta e número de espécimes por terrário. No laboratório, a manutenção consistia em umedecer a terra em intervalos de três dias, quando os moluscos eram também supridos com alimentação—constituída de vegetais como alface, pepino e cenoura. O processo para obtenção da hemolinfa e posterior análise das células foi dividido em cinco etapas, sendo estas: punção para extração da hemolinfa, câmara úmida, fixação no *Methanol*, coloração com *Giemsa* e montagem de lâminas permanentes para observação ao microscópio ótico. Para a avaliação bioquímica, a hemolinfa obtida foi transferida para microtúbulos banhados no gelo e posteriormente processada no Analisador Bioquímico A15 da *Biosystems*. A análise morfológica preliminar, realizada ao microscópio ótico, possibilitou a identificação de um tipo celular mais numeroso, representado por células maiores, de aspecto estrelado, devido a emissão de numerosos prolongamentos citoplasmáticos, denominado

Granulócito e outro tipo celular, menor e menos frequente, de aspecto arredondado, denominado de Hialinócito. Estes resultados representam o primeiro estudo sobre hemócitos circulantes da hemolinfa da *Achatina fulica*. A análise bioquímica sugeriu que os caracóis analisados no presente estudo estariam sob condições fisiológicas normais, ao exibir valores médios de 4,6 mg/dL para glicose e de 20,4 g/L para proteínas totais, contudo o elevado valor médio de 80,8 mg/dL verificado para ureia, pode sugerir um possível início do processo de estivação.

Palavras-chave: *Achatina fulica*; hemolinfa; hemócitos; análise bioquímica; glicose, proteínas totais, ureia.

ABSTRACT

Achatina fulica Bowdich, 1822, is a terrestrial pulmonate mollusc, known as giant African snail, originated from Africa. When introduced in Brazil, it showed a great adaptive behavior considering its general habit, resistance to environmental changes and numerous reproductive strategies. The biological invasions are the second reason to biodiversity lost once they can cause an ecological cycle disorder and because this fact, *Achatina fulica* has been considered a potential pest in agriculture, domestic gardens and native forests. Also, it can be an intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* Chen, 1935, nematode causing meningoencephalitis in people, and of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971, who could provoke abdominal angiostrongyliasis. Both had been found in Brazil. In order, to provide a better understanding about *A. fulica*'s resistance and contribute to forthcoming studies that correlate the African snail's internal defense system with its adaptive capacity and serve as host of parasites that are significant to public health, this study aimed to describe and characterize the hemocytes circulating in the snail's hemolymph and to analyze the biochemistry of hemolymph, as well. To establish a colony in the laboratory, snails were collected in three residential area of Rio de Janeiro city during the years of 2016 and 2017. In the laboratory, the animals were placed inside of plastic and glass terrariums filled with sterilized soil, which were labeled with location, data and number of specimens. The animals were also fed with vegetables such as lettuce, cucumber and carrot every three days when the soil was moistened as well. The process for obtaining hemolymph and subsequent cells analysis was divided in five steps: puncture for hemolymph extraction, wet chamber phase, fixation in *Methanol* phase, staining with *Giemsa* phase, and permanent microscope slides producing. For the biochemical analysis, the collected hemolymph was placed inside of microtubes and processed by *Biosystems* biochemical analyzer. In the primary morphological analysis two hemocyte types were identified: Granulocyte, large and abundant cells, showing a star shape as a result of the numerous cytoplasmic prolongations and Hialinocyte, small, rare, and poorly spreading cells, characterized, therefore, by its round shape. This results represent the prisoner study about the circulating hemocytes in *Achatina fulica* hemolinf. The biochemical analysis suggested that the snails analyzed in the present study would be under normal physiological conditions, with a average value of 4.6 mg/dL for glucose, 20.4 g/L for total proteins. Yet, a high value of 80.8 mg/dL for urea, could suggest a possible start of the aestivation process.

Keywords: *Achatina fulica*; hemolymph; hemocytes; biochemical analysis; glucose, total protein and urea.

SUMÁRIO

	Pag.
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema Reprodutor de <i>Achatina fulica</i>	2
1.2. Hábito Alimentar de <i>Achatina fulica</i>	3
1.3. Estratégias adaptativas de <i>Achatina fulica</i>	4
1.4. <i>Achatina fulica</i> : problemas ambientais e de saúde pública	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Local e período de coleta	9
2.2. Manutenção dos moluscos no laboratório	10
2.3. Obtenção e análise celular e bioquímica da hemolinfa de <i>Achatina fulica</i> ..	10
2.4. Observação das amostras de hemolinfa ao microscópio óptico	11
2.5. Análise Bioquímica da hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	12
3. RESULTADOS	13
3.1. Análise Bioquímica da hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	13
3.2. Caracterização dos hemócitos circulantes na hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	13
3.2.1. Granulócitos	14
3.2.2. Hialinócitos	17
3.3. Análise Bioquímica da hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	19
4. DISCUSSÃO	19
4.1. Sistema de defesa interno de moluscos	19
4.2. Bioquímica da hemolinfa do caracol africano	23
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE TABELAS

	Pag.
1. Análise quantitativa de hemócitos circulantes na hemolinfa de filhotes de <i>Achatina fulica</i>	18
2. Análise quantitativa de hemócitos circulantes na hemolinfa de espécimes adultos de <i>Achatina fulica</i>	18
3. Análise bioquímica da hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	19

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
1. Espécime adulto de <i>Achatina fulica</i>	1
2. Espécime de adulto de <i>Achatina fulica</i> liberando o epifragma ao sair do processo de estivação	5
3. Mapa de distribuição de <i>Achatina fulica</i> em 23 estados do Brasil	6
4. Ciclo Biológico das espécies de <i>Angiostrongylus</i> Kamensky, 1905	7
5. Local de coleta de <i>Achatina fulica</i> em área residencial no bairro de Santa Cruz, RJ	9
6. Local de coleta de <i>Achatina fulica</i> em área residencial no bairro de Santa Cruz, RJ	9
7. Manutenção de <i>Achatina fulica</i> em condições experimentais	10
8. Etapas do processo de análise das células circulantes na hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	11
9. Etapas do processo de análise das células circulantes na hemolinfa de <i>Achatina fulica</i>	13
10. Células circulantes da hemolinfa de um espécime jovem de <i>Achatina fulica</i> - Granulócitos com filopodia em desenvolvimento	14
11. Células circulantes da hemolinfa de um espécime jovem de <i>Achatina fulica</i> - Granulócitos com filopodia em desenvolvimento	15
12. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de <i>Achatina fulica</i> - Granulócitos com filopodia acentuada	15
13. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de <i>Achatina fulica</i> - Granulócitos com filopodia acentuada	16
14. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de <i>Achatina fulica</i> - Granulócitos com filopodia acentuada	16
15. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de <i>Achatina fulica</i> - Hialinócito	18

1- INTRODUÇÃO

Os moluscos constituem, depois dos artrópodes, o grupo zoológico de invertebrados com maior número de espécies representadas no meio terrestre, contudo, podem viver na água doce e oceanos, sendo encontrados em quase todos os tipos de habitats, de desertos a florestas tropicais, lagoas, riachos, poças de maré, costões rochosos e grandes profundidades oceânicas (Thiengo *et al.*, 2005).

Pertencente à classe Gastropoda e à família Achatinidae, *Achatina fulica* Bowdich, 1822, é um molusco pulmonado terrestre, conhecido como caramujo gigante africano (Telles *et al.*, 1997), todavia, trataremos a espécie como caracol gigante africano, pois os moluscos terrestres são caracóis e os aquáticos denominados de caramujos (Eduvirgem & Ferreira, 2017). Esta espécie de caracol apresenta concha espiralada; cabeça com dois pares de tentáculos, um deles contendo os olhos; pé muito desenvolvido e massa visceral com giro de cento e oitenta graus (Caetano, 2005) (Figura 1). Os adultos podem atingir 20 cm de comprimento de concha e 500 gramas de peso total (Thiengo *et al.*, 2005).



Figura 1. Espécime adulto de *Achatina fulica*. Barra = 10 cm

Fonte: autora.

A espécie é originária da África, ocorrendo de Moçambique no sul do Quênia à Somália ao norte, *A. fulica* faz parte das espécies que se diferenciaram principalmente nas margens das florestas (Raut & Barker 2002).

1.1 - Sistema Reprodutor de *Achatina fulica*

Entre as características biológicas de *A. fulica* se destacam, o alto potencial reprodutivo e hábito alimentar generalista (Raut & Barker 2002). O processo reprodutivo requer um alto investimento, uma vez que o molusco utiliza grande parte de seu estoque energético para produção e armazenamento de gametas, para exibir comportamento de corte, para cópula e desenvolvimento dos embriões (Chicarino, 2013).

Achatina fulica apresenta um interessante sistema reprodutor, pois é um molusco hermafrodita protândrico, ou seja, apresenta ambos os sexos, sendo a maturação da gônada masculina anteriormente à da feminina, com cópula recíproca, o que caracteriza uma estratégia eficaz, uma vez que ambos os caracóis são fecundados (Fischer & Costa, 2010). De acordo com Tomiyama (1992), caracóis jovens produzem apenas espermatozoides, porém os adultos são capazes de produzir os dois tipos de gametas, masculino e feminino. Assim, os animais são agrupados em três classes reprodutivas: imaturos - sem gônadas desenvolvidas; adultos jovens - só com a porção da gônada masculina desenvolvida; e adultos velhos - animais hermafroditas funcionais (Tomiyama & Nakane, 1993). Ainda, de acordo com Fischer *et al.* (2005), a maturidade é alcançada com cerca de 4 meses e o caracol africano apresenta uma longevidade de três a cinco anos. Tomiyama (2002), porém, ressalta que a espécie se torna sexualmente ativa quando o perístoma mede 0,05 centímetros. O mesmo autor também evidencia que a partir do desenvolvimento do aparelho feminino, a concha do caracol para de crescer.

A oviposição de *A. fulica* é influenciada por fatores bióticos e abióticos. Fischer & Costa (2010) relataram que em alguns casos, os ovos fecundados podem permanecer retidos no útero até poucas horas antes da eclosão, sendo esta estratégia importante em condições ambientais instáveis e locais com presença de muitos predadores e parasitas. A oviposição pode ocorrer do décimo ao trigésimo dia após a cópula, dependendo da disponibilidade de cálcio e albumina (*op. cit.*), portanto gastrópodes terrestres estocam grandes quantidades de sais de cálcio, que são depositados principalmente, na concha e na glândula digestiva (Paschoal & Amato, 1996).

De acordo com Fischer & Costa, 2010, os óvulos fecundados recebem albume da glândula albuminífera e cobertura de calcário, por isso, no período reprodutivo esta glândula pode exceder o tamanho da glândula digestiva, alterando, inclusive, a quantidade de aminoácido presente no corpo do caracol. Os achatinídeos produzem

ovos com casca, por causa da disponibilidade de cálcio que serve também para formação da concha do embrião (*op. cit.*).

A frequência de oviposição está relacionada com a duração do período favorável para a viabilidade dos ovos, refletindo em uma variação sazonal com picos acentuados no início da estação chuvosa (Fischer & Costa 2010). As posturas podem ter de treze a quatrocentos e quarenta e dois ovos, sendo a variabilidade muito grande, mesmo dentro de uma população (Raut & Barker 2002). Em geral, podem ocorrer de duas a treze posturas durante toda a vida (Berry & Chan, 1968). Há também uma correlação positiva entre o número de ovos e o tamanho do molusco, sendo que os animais maiores depositam mais ovos (Fischer & Costa, 2010). Eduvirgem & Ferreira (2017) afirmam que o rápido crescimento da população se dá por estratégia reprodutiva, pela grande dispersão, pelas vantagens competitivas com moluscos nativos e pelas condições ambientais favoráveis.

1.2 - Hábito Alimentar de *Achatina fulica*

Sobre o hábito alimentar da espécie, Fischer *et al.* (2008) salientam que a disponibilidade de diferentes recursos alimentares que gere possibilidade de escolha, bem como a abundância de alimentos, podem ter um efeito importante na dinâmica da população, pois estes fatores podem influenciar a taxa de crescimento, a sobrevivência, a fecundidade, uma vez que a aquisição de diferentes nutrientes resulta em indivíduos maiores em um curto espaço de tempo.

Achatina fulica é uma espécie herbívora generalista (Pereira *et al.*, 2005). Raut & Barker (2002) afirmam que sua evolução em bordas de florestas, além de lhe conferir a incorporação de inúmeras estratégias de defesa contra fatores bióticos e abióticos, também o programou para o consumo de uma grande diversidade de recursos alimentares. A alimentação não inclui somente folhas, mas também flores, caules e frutos (Sarma *et al.*, 2015), sendo, portanto, considerada uma praga agrícola por promover grandes prejuízos a lavouras e plantações comerciais, e invadindo hortas em áreas domiciliares – seu habitat mais comum – sendo também encontrado em árvores, sobre material em decomposição e próximo a depósitos de lixo, alerta Vasconcellos & Pile (2001). Em João Pessoa-PB, no bairro do Castelo Branco, Carvalho (2006) constatou a presença dos caracóis em sítios, quintais e jardins, onde escalavam coqueiros, mamoeiros e bananeiras (aparentemente apenas repousando ou se abrigando de predadores durante o dia) e se alimentando de folhas de alface, pimentão, milho,

feijão, quiabo, jerimum, erva cidreira e frutos de acerola, além de plantas ornamentais, principalmente helicônias. Assim, parte-se da premissa que a complexidade estrutural do ambiente, devido aos inúmeros substratos possíveis de serem utilizados como refúgio, somado à disponibilidade de alimentos de fácil consumo é um dos principais fatores que favorecem o aumento populacional dessa espécie invasora (Fischer *et al.*, 2008).

Em seu livro, Fischer & Costa (2010) caracterizaram um hábito alimentar dos caracóis recém-eclodidos que retiram elementos orgânicos e inorgânicos da casca do ovo, dos ovos que não eclodem e do solo. Os jovens, até aproximadamente quatro meses, alimentam-se, em sua maioria, de brotos jovens e folhas suculentas, sendo essa a fase mais danosa para as plantas. Após o quarto mês de vida, preferem alimentos em decomposição e seu hábito alimentar passa a ser caracterizado como oportunista e onívoro. Quando existe uma necessidade grande de cálcio, Rodrigues *et al.* (2007) atestam que *A. fulica* pode se tornar canibal, devorando ovos e caramujos jovens da mesma espécie ou pode escalar edificações e muros, retirando deles o cálcio necessário.

Em seu trabalho em 2008, Fischer *et al.*, enfatizaram a preferência de *A. fulica* por certos alimentos, como couve e alface, sugerindo a existência de seleção de alimento, que pode se dar antes e depois da ingestão, sendo na primeira fase avaliados cheiro, textura, palatabilidade e habilidade na manipulação e na segunda, a digestibilidade e os nutrientes.

1.3 - Estratégias adaptativas de *Achatina fulica*

Os caracóis em estudo, além das características acima citadas, apresentam estratégias que são base para alta adaptabilidade da espécie (Fischer & Costa, 2010), caracterizando-os como uma das pragas mais importantes entre os invertebrados, em escala mundial, de acordo com Rodríguez (2006). Ainda que seja uma espécie de zonas quentes, pode se adaptar a qualquer tipo de habitat (*op. cit.*). Durante o dia, ficam enterrados ou suspensos em caules de árvores ou outros substratos como, por exemplo, muros e paredes de casas e em ambas as situações, os animais podem produzir o epifragma (Figura 2), uma estrutura calcificada que previne a desidratação, possibilitando longos períodos em estivação (Fischer, 2009). Os gastrópodes terrestres perdem água pelo tegumento e, do mesmo modo, se reidratam pelo tegumento, através da chamada reidratação por contato. Quando em situações de estresse hídrico e altas temperaturas, estratégias fisiológicas e comportamentais, tais como a estivação, que se

caracteriza pela retração da massa cefalopodal no interior da concha, secreção do epifragma e o enterramento, garantindo a sobrevivência durante períodos desfavoráveis (D'Ávila *et al.*, 2004), além do comportamento gregário, que segundo Almeida (2016) cria um microclima úmido dentro do grupo.



Figura 2. Espécime adulto de *Achatina fulica* liberando o epifragma (seta) ao sair do processo de estivação. Barra = 3 cm. Fonte: autora.

1.4 - *Achatina fulica*: problemas ambientais e de saúde pública

A introdução de espécies exóticas é considerada a segunda maior causa de extinção de espécies no planeta, o que afeta diretamente a biodiversidade (Coradin & Tortato, 2006) e ainda de acordo com Pimentel *et al.*, 2001, espécies invasoras causam significantes problemas ambientais e econômicos no mundo. No Brasil, o caracol africano foi introduzido no final da década de 1980, como alternativa para criação comercial e consumo humano do escargot, *Helix aspersa* Muller, 1774 e atualmente, ocorre em populações elevadas na área urbana de vários municípios de 23 estados (Colley & Fischer, 2009) (Figura 3).

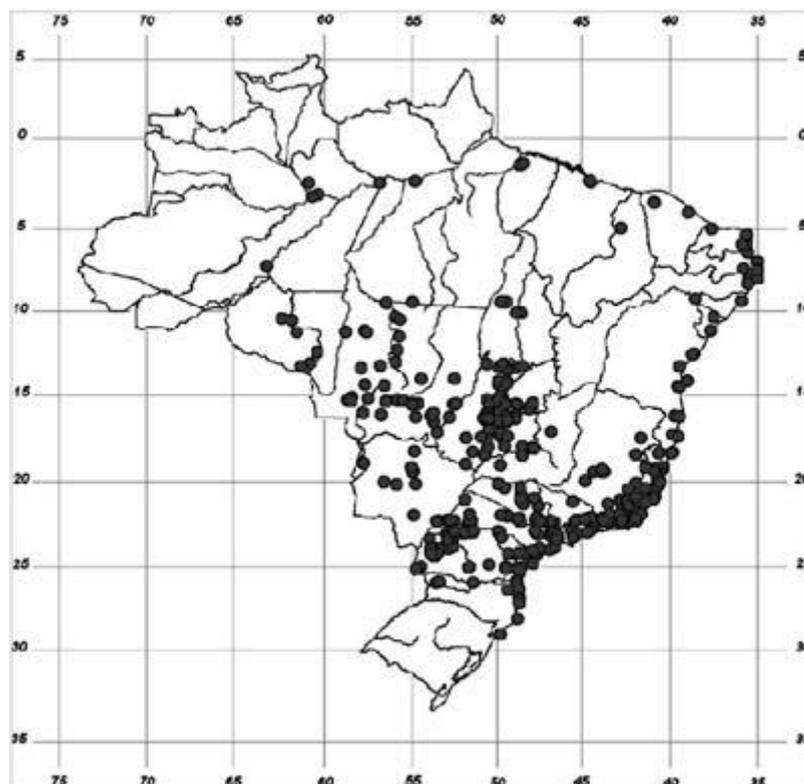


Figura 3. Mapa de distribuição de *Achatina fulica* em 23 estados do Brasil. Fonte: FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz.

O caracol é classificado entre as cem piores espécies invasoras de ocorrência mundial de acordo com Fischer & Colley, 2005. Neste mesmo trabalho, os autores também alertam para o problema ambiental desencadeado pela presença de *A. fulica* com o estabelecimento de grandes populações em florestas primárias e secundárias, como registrado em Ilhas Havaianas, a competição com a fauna nativa e a perturbação florística, uma vez que representam uma espécie altamente voraz e generalista, causando sérios danos econômicos em áreas agrícolas.

A significativa ocupação de ambientes antrópicos pelo caramujo africano é preocupante visto que esses animais podem atuar na transmissão de agentes etiológicos que podem determinar o estabelecimento de graves doenças em humanos e outros animais, como a angiostrongilíase, helmintose provocada por espécies de *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 (Durço *et al.*, 2013). Tais espécies utilizam o molusco como hospedeiro intermediário, com a infecção ocorrendo pela ingestão de larvas de primeiro estágio (L1) nas fezes de roedores e que se desenvolvem até o terceiro estágio (L3) (op. cit.). Esses parasitos têm como hospedeiro definitivo natural roedores como *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758, que

se infectam através da ingestão do molusco, vegetais ou água contaminada contendo a larva de terceiro estágio (L3) (op. cit.). A infecção para o homem (hospedeiro acidental) também se dá através de larvas de terceiro estágio (L3), que podem ser encontradas em alimentos crus, mal-cozidos ou através da própria ingestão do molusco (op. cit.), (Figura 4).

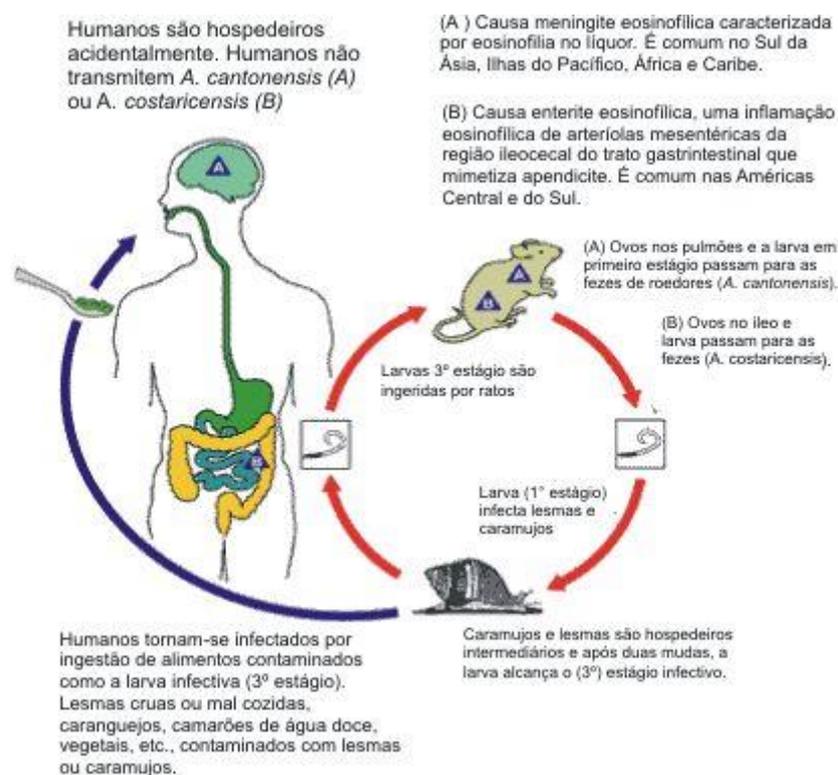


Figura 4. Ciclo Biológico das espécies de *Angiostrongylus* Kamensky, 1905. Fonte: CDC - Center for Disease Control and Prevention.

Angiostrongylus cantonensis Chen, 1935 na Ásia e nas ilhas do Pacífico e *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 nas Américas são nematóides intra-arteriais que podem causar meningite eosinofílica e angiostrongilíase abdominal, respectivamente (Neuhauss *et al.*, 2007).

Meningite é um processo inflamatório das meninges que pode ser potencialmente fatal devido à geração de diversos estímulos que podem comprometer órgãos nobres do SNC, órgãos esses que apresentam reduzida taxa de regeneração (Cunha *et al.*, 2017). Dentre os agentes etiológicos parasitários, *Angiostrongylus* sp. merece destaque por sua maior incidência em causar meningites eosinofílicas (op. cit.). A doença causada por *A. cantonensis* é considerada emergente no Brasil e destaca-se

pela disseminação do parasita ser favorecida por um grande aumento do número de caracóis terrestres, especialmente da espécie *A. fulica* (*op.cit.*).

No Brasil, larvas de *A. cantonensis* foram encontradas em *A. fulica* procedentes do Estado de São Paulo e casos de meningite eosinofílica foram registrados nos Estados do Espírito Santo e de Pernambuco (Zanol *et al.*, 2010). Estes autores, no mesmo trabalho afirmam que *Aelurostrongylus abstrusus* Railliet, 1898, nematóide parasito de pulmão de felídeos causando pneumonia, é o metastrongilídeo mais frequentemente detectado em exemplares de *A. fulica* examinados no Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica (LRNM, IOC, FIOCRUZ).

Em relação à angiostrongilíase abdominal, entre os principais sinais e sintomas estão dor abdominal na fossa ilíaca, febre, algumas vezes acompanhada de calafrio e lesão hepática (Morena, 1988).

Em seu trabalho sobre espécies invasoras, Ziller & Zalba (2007) afirmam que há casos suficientes de impactos, tanto sobre a biodiversidade como sobre a economia, a saúde e valores culturais, para que não restem dúvidas sobre o potencial de risco e de dano que tendem a causar.

2- OBJETIVOS

De forma a possibilitar maior conhecimento sobre aspectos relacionados à resistência apresentada por este molusco invasor, o presente estudo teve por objetivo descrever o padrão de desenvolvimento do sistema de defesa interna de *A. fulica* e caracterizar a composição bioquímica de sua hemolinfa, fornecendo subsídios para estudos futuros de correlação entre o sistema de defesa interno do molusco e sua comprovada capacidade adaptativa e como hospedeiro de parasitos com grande relevância para a saúde pública.

1. Descrever e caracterizar quantitativamente e qualitativamente as células da hemolinfa;
2. Determinar o conteúdo de glicose e produtos nitrogenados: proteínas totais e ureia.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Local e período de coleta

A coleta dos espécimes de *Achatina fulica* foi feita em áreas residenciais de três bairros da cidade do Rio de Janeiro em diferentes períodos nos anos de 2016 e 2017. Foram coletadas amostras oriundas de Campo Grande, Santa Cruz e Estrada da Posse, em Nova Iguaçu, totalizando 31 espécimes (Figuras 5 e 6). Os procedimentos utilizados para coleta incluíram uso de luva, de forma a evitar qualquer risco de infecção e acondicionamento dos moluscos em recipientes plásticos para transporte até o Laboratório de Ecologia e Biologia de Helmintos, da Área de Biologia/DBA/UFRRJ.



Figura 5. Local de coleta de *Achatina fulica* em área residencial no bairro de Santa Cruz - RJ.

Fonte: Elaborada por Daniela Monteiro



Figura 6. Local de coleta de *Achatina fulica* em área residencial no bairro de Santa Cruz - RJ.

Fonte: Elaborada por Daniela Monteiro.

2.2 - Manutenção dos moluscos no laboratório

Os moluscos, ao serem trazidos para o laboratório, foram alocados em recipientes de vidro ou plástico, devidamente etiquetados com local de procedência, data da coleta e número de espécimes por terrário. Foram usadas tampas de tecido, o que proporciona boa ventilação e uma barreira física contra penetração de insetos e outros organismos.

No terrário, os animais eram mantidos em terra esterilizada e umedecida a cada 3 dias, quando os moluscos eram também supridos com alimentação composta por vegetais como alface, pepino e cenoura (Figura 7). Sempre que era realizada a manutenção dos moluscos, também se procedia a procura por posturas. As posturas, quando localizadas eram removidas e realocadas em outros terrários com a mesma condição descrita anteriormente, onde foram feitas avaliações quantitativas dos ovos, assim como sua viabilidade.



Figura 7. Manutenção de *Achatina fulica* em condições experimentais. Fonte: autora.

2.3 - Obtenção e análise celular e bioquímica da hemolinfa de *Achatina fulica*

A hemolinfa foi obtida de moluscos nascidos no laboratório e de moluscos adultos provenientes da coleta.

O processo para obtenção e análise da hemolinfa foi dividido em 3 etapas (Figura 8). Para iniciar a obtenção, calçando luvas de procedimento, cada molusco retirado do terrário foi lavado em água corrente e o tamanho de sua concha foi medido com auxílio de uma régua.

Usando uma tesoura ponta fina, foi feito um pequeno furo de aproximadamente 0,3 cm na concha correspondente à região pericárdica. Com uma seringa descartável para insulina 1ml, uma amostra de 0,7 ml de hemolinfa foi retirada e reservada.

Na primeira etapa, Câmara úmida, as placas de Petri foram revestidas por filtros de papel umedecidos, contendo 4 lâminas cada. As lâminas receberam uma gotícula da hemolinfa obtida e permaneceram na câmara por aproximadamente 30 minutos.

Após o período de repouso, na câmara úmida, as lâminas foram transferidas para outras placas de Petri, na etapa de Fixação, contendo *metanol para análise* (CH₃OH) suficiente para cobri-las por 15 minutos.

Após a etapa de fixação, as lâminas foram coradas durante 3 minutos, imersas em uma solução de concentração 3:1, contendo 50 ml de *Giemsa's azur eosin methylene blue* e 150 ml de água destilada. No final, as lâminas foram lavadas em água corrente e alguns dias após a secagem, receberam uma pequena gota de *bálsamo do Canadá (natural)* e foram cobertas com lamínulas, de forma a proteger o material, possibilitando a conservação por tempo indeterminado e a melhor observação das células.

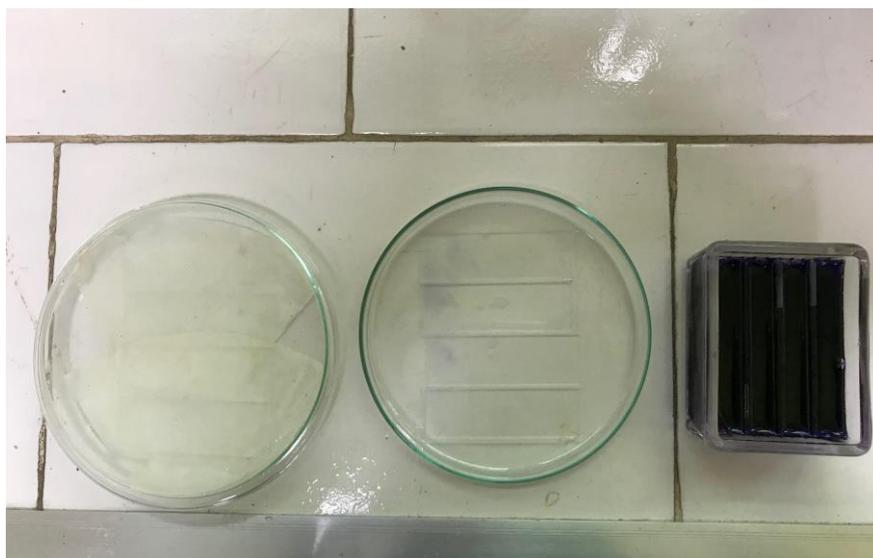


Figura 8. Etapas do processo de análise das células circulantes na hemolinfa de *Achatina fulica*.

2.4 - Observação das amostras de hemolinfa ao microscópio óptico

A observação das lâminas preparadas foi realizada no Laboratório de Ecologia e Biologia de Helminhos, da Área de Biologia, do Departamento de Biologia Animal/UFRRJ utilizando o *Microscópio Biológico Óptico Trinocular Even*, sendo necessário o uso do *óleo de imersão* sobre a lamínula para possibilitar a observação em objetiva de 100x.

As células foram observadas usando-se o Microscópio Zeiss AxioScope, acoplado à câmera Zeiss AxioCam e as imagens foram capturadas pelo uso do software Zen 2009 para a captura e análise de imagens no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, FIOCRUZ, RJ.

2.5 - Análise Bioquímica da hemolinfa de *Achatina fulica*

Para o processo da análise bioquímica, com o uso de luvas estéreis, oito caracóis adultos, com tamanho médio de 7,4 cm de concha, foram lavados em água corrente e reservados. Na etapa da punção, porém, a obtenção da hemolinfa ficou impossibilitada em três caracóis, pois os mesmos se retraíram dentro da concha. Utilizando, portanto, cinco indivíduos de tamanho médio 7,8 cm, de onde foi retirado aproximadamente, 1 ml de hemolinfa e reservado dentro de microtubos estéreis tipo Eppendorf, numerados e mantidos em banho de gelo durante toda a coleta (Costa, 2011; Tunholi-Alves *et al*, 2015) (Figura 9).

As amostras numeradas foram transferidas e processadas no *Analizador Bioquímico A15 Biosystems* por cerca de trinta minutos e neste procedimento foram analisadas as quantidades de glicose, onde os resultados foram expressos em mg/dL, produtos nitrogenados - proteínas totais, sendo expressas em g/L e ureia, tendo resultado expresso em mg/dL.

Na determinação de glicose, 3 μ L de amostra foram adicionados a 300 μ L de reagente de cor (fosfato 100mmol/L, fenol 5mmol/L, glicose oxidase 10U/mL, peroxidase 1U/mL, 4-aminoantipirina 0.4mmol/L, pH 7.5), e o produto da reação de oxidação 4-aminoantipirina foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 510nm (Trinder, 1969). Para a determinação da concentração de proteínas totais, 4 μ L de amostra foram adicionados a 300 μ L de reagente de cor (acetato de cobre 6 mmol/L, iodeto de potássio 12mmol/L, hidróxido de sódio 1,15mol/L). O padrão usado foi albumina sérica bovina, na concentração de 50g/L. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540nm, e os resultados expressos em g/L (Gornall *et al.*, 1949). A concentração de ureia foi mensurada utilizando-se de 3 μ L de amostra e 300 μ L de reagente (Tris 100mmol/L, 2-oxoglutarato 5,6 mmol/L, urease > 140U/mL, glutamato desidrogenase >140U/mL, etilenoglicol 220g/L, azida sódica 9,5g/L, NADH 1.5 mmol/L, pH 8.0). O produto formado foi determinado por espectrofotometria com absorvância máxima a 340nm, usando uma solução-padrão de ureia na concentração de 50mg/dL (Talke & Schubert, 1965; Gutmann & Bergmeyer, 1974).

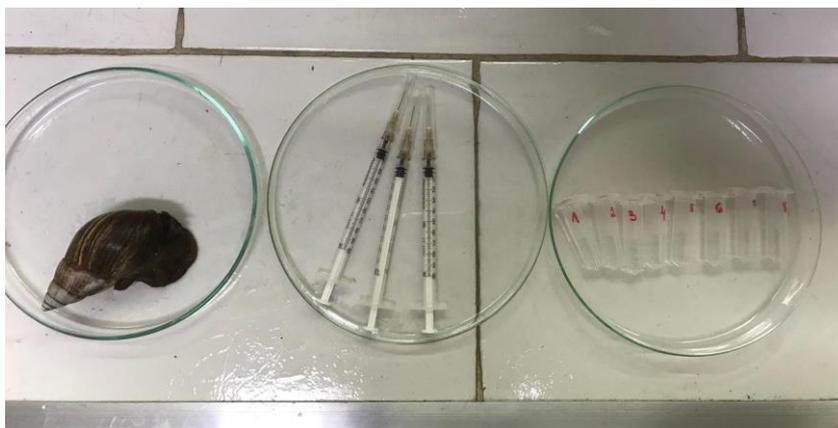


Figura 9. Etapas do processo para obtenção de hemolinfa de *Achatina fulica* para análise bioquímica.

3 - RESULTADOS

3.1 - Manutenção dos moluscos em laboratório

No laboratório, os caracóis adultos apresentaram boa adaptação às condições nos terrários. Houve, entretanto, uma taxa de mortalidade nos caramujos trazidos da localidade da Posse, em Nova Iguaçu, por suspeita de contaminação pelas larvas do mosquito da família Phoridae, e uma alta taxa de mortalidade dos caracóis nascidos no laboratório, provavelmente por serem mais sensíveis às condições adversas e também o canibalismo citado por Rodrigues *et al.*, 2007, foi constatado. Ao serem alimentados com os vegetais alface, pepino e cenoura, os moluscos mostraram significativa preferência pelos dois primeiros.

3.2 - Caracterização dos hemócitos circulantes na hemolinfa de *Achatina fulica*

Como em outros moluscos, os hemócitos circulantes de *A. fulica*, são representados, aparentemente, por dois tipos celulares distintos entre si.

A análise morfológica, realizada ao microscópio óptico, possibilitou a observação de células circulantes na hemolinfa de *A. fulica*, com base nas características morfológicas dessas células foi possível a identificação de dois tipos celulares distintos entre si. A denominação dos tipos celulares como granulócitos e hialinócitos adotada neste trabalho corresponde aos tipos descritos por Ottaviani (1989). Um tipo celular mais numeroso, representado por células maiores, de aspecto estrelado, devido a emissão de numerosos prolongamentos citoplasmáticos, delgados e longos (filopódios),

denominado granulócito e outro tipo celular, comparativamente, de tamanho mais reduzido e menos frequente, apresentando aspecto arredondado, denominado de hialinócito.

3.2.1 - Granulócitos

A identificação dos granulócitos circulantes na hemolinfa de *A. fulica* seguiu conforme estabelecido pelos autores Ottaviani (1989); Adamowicz & Bolaczek (2003), que os chamaram de hemócito I. Dessa forma, as células maiores, polimórficas devido à intensa filopodia, com citoplasma contendo grânulos e encontradas em maior número na hemolinfa dos caracóis jovens e adultos, algumas vezes formando agregados, foram classificadas como granulócitos.

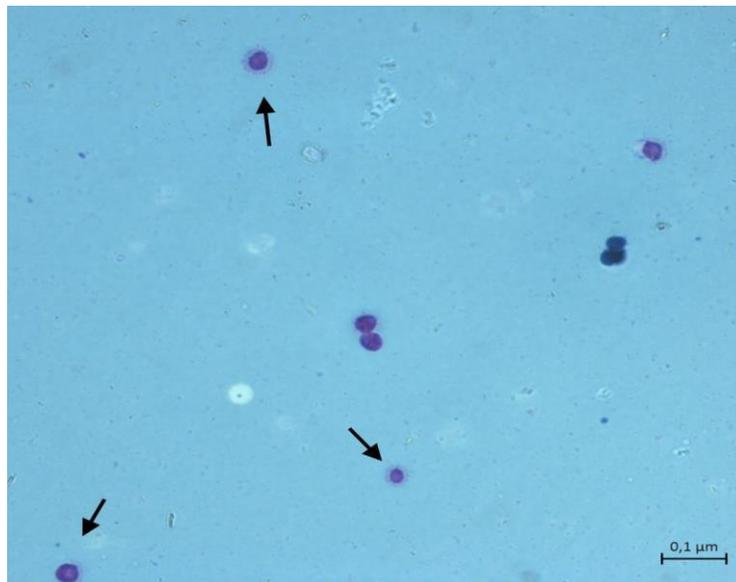


Figura 10. Células circulantes da hemolinfa de um espécime jovem de *Achatina fulica*, as setas indicando granulócitos com filópodes em desenvolvimento.

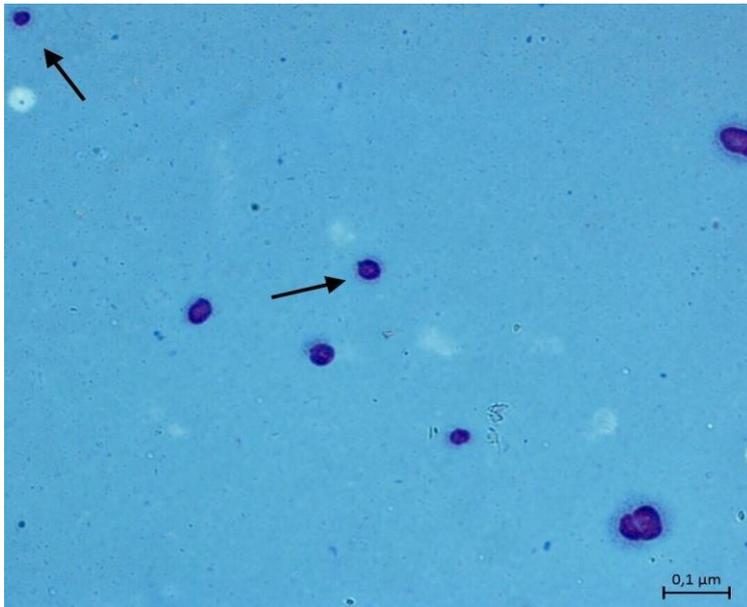


Figura 11. Células circulantes da hemolinfa de um espécime jovem de *Achatina fulica*, as setas indicando granulócitos.



Figura 12. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de *Achatina fulica*, as setas indicando granulócitos, com filopodia acentuada.

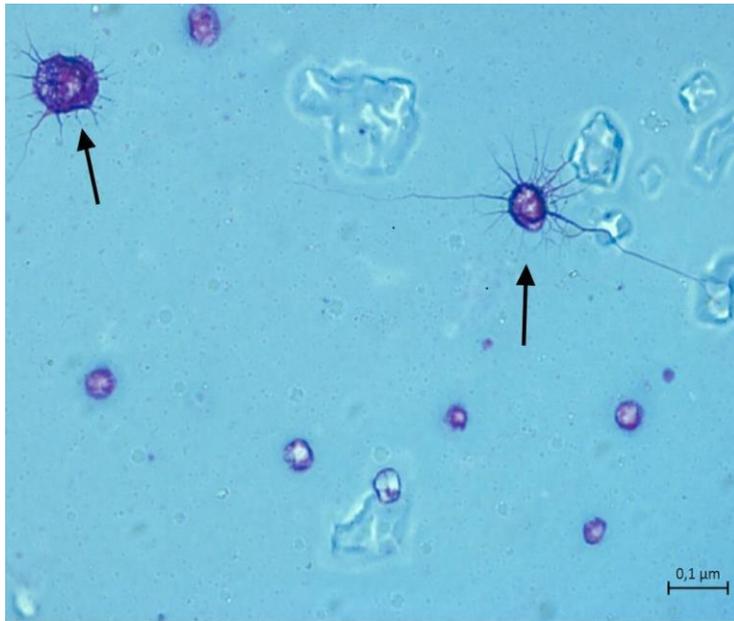


Figura 13. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de *Achatina fulica*, as setas indicando granulócitos, com filopodia acentuada.



Figura 14. Células circulantes da hemolinfa de um espécime adulto de *Achatina fulica*, a seta indicando granulócito, com filopodia acentuada

Na hemolinfa obtida de caracóis com 9 meses de idade e conchas medindo em média 2,14 cm de comprimento, observou-se grande quantidade de granulócitos, embora a visualização não tenha sido possível em todas as lâminas preparadas com hemolinfa. Resultados semelhantes foram obtidos na análise da hemolinfa obtida de moluscos adultos, com comprimento das conchas variando entre 4,5 cm e 9,0 cm e tamanho médio de 7,4 cm, de acordo com as Tabelas 1 e 2. Os granulócitos apresentaram tamanho médio de 0,095 μm , núcleo de localização central ou irregular, se destacando pela reação mais intensa pelo *azul de metileno*, um dos componentes do *Giemsa*. Morfologicamente, foi possível a observação de vários grânulos citoplasmáticos ao redor do núcleo. De forma a complementar os resultados obtidos, no presente estudo, será necessária uma avaliação histoquímica para a determinação da natureza química dessas granulações. Estas células apresentaram maiores e menores prolongamentos, com média de 0,08 μm e 0,06 μm , respectivamente e em sua maioria, células com maiores prolongamentos também apresentaram maior quantidade de grânulos. Comparativamente, os hemócitos com prolongamentos pouco desenvolvidos apresentaram, de mesmo modo, uma granulação reduzida. Em geral, os granulócitos oriundos dos filhotes foram os que apresentaram filopódios menos desenvolvidos, onde em alguns destes foi observado um possível comportamento mitótico (Figuras 10, 11, 12, 13 e 14).

3.2.2 - Hialinócitos

Outro tipo de hemócito circulante constatado, observado em menor número em ambos os caracóis, filhotes e adultos, foi o hialinócito. Este tipo de hemócito, caracterizou-se por apresentar dimensões mais reduzidas, quando comparados aos granulócitos, com diâmetro médio de 0,03 μm , com núcleo grande, ovóide e centralizado, uma área citoplasmática reduzida ao redor do núcleo, evidenciada através do corante eosina, apresentando, portanto, uma alta relação núcleo/citoplasma, não sendo observada a emissão de filopódios através do citoplasma e granulação (Figura 15).

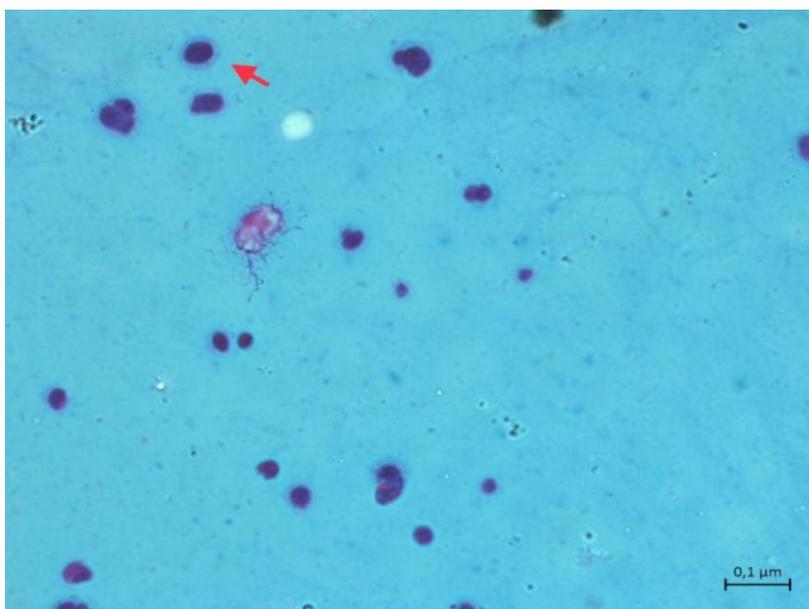


Figura 15: Células circulantes da hemolinfa de um filhote de *Achatina fulica*, a seta indicando hialinócito.

Tabela 1. Análise quantitativa de hemócitos circulantes na hemolinfa de filhotes de *Achatina fulica*.

Caracóis	Comprimento da concha (cm)	Granulócitos	Hialinócitos
Filhote 1	2,0	7	-
Filhote 2	2,7	24	3
Filhote 3	2,3	7	-
Filhote 4	1,8	-	-
Filhote 5	2,8	-	-
Filhote 6	2,0	-	-
Filhote 7	1,5	-	-
Filhote 8	2,0	-	-

Tabela 2. Análise qualitativa de hemócitos circulantes na hemolinfa de espécimes adultos de *Achatina fulica*.

Caracóis	Comprimento da concha (cm)	Granulócitos	Hialinócitos
Adulto 1	7,5	16	1
Adulto 2	8,0	-	-
Adulto 3	7,4	-	-
Adulto 4	9,0	5	-
Adulto 5	4,5	-	-
Adulto 6	7,3	-	-
Adulto 7	7,0	-	-
Adulto 8	8,5	-	-

3.3 - Análise Bioquímica da hemolinfa de *Achatina fulica*

As quantidades de glicose e produtos nitrogenados, proteínas totais e uréia da hemolinfa dos cinco caracóis analisados, estão expressas na Tabela 3, onde pode-se observar valores médios de 4,6 mg/dL, 20,4 g/L e 80,8 mg/dL, respectivamente.

Tabela 3. Análise bioquímica da hemolinfa de *Achatina fulica*.

Caracóis	Comprimento da concha (cm)	Glicose (mg/dL)	Proteínas totais (g/L)	Ureia (mg/dL)
1	7,5	3	22	49
2	8,0	3	28	89
3	7,4	4	22	51
4	9,0	4	15	90
5	7,3	9	15	125

4 - DISCUSSÃO

4.1 - Sistema de defesa interno de moluscos

Achatina fulica possui diversas estratégias de defesa, como a produção do epifragma, uma estrutura calcificada e impermeável, produzida em condições ambientais desfavoráveis (Fischer, 2009), a estivação, onde D'ávila *et al.* (2009) aponta como uma das possíveis causas da ineficiência na aplicação de molucidas e sua concha, que representa uma barreira física servindo de proteção primária, sendo estas características observadas nos moluscos no laboratório. Segundo Fischer & Costa (2010) em relação ao molusco ancestral, a conversão da concha de um escudo para um refúgio tenha sido uma vantagem morfológica contra diferentes situações, por exemplo o ataque por um predador ou fatores abióticos, como por exemplo a evaporação.

O sistema circulatório é em geral aberto e o sistema de defesa dos caracóis africanos está associado à sua hemolinfa, que é composta pelo plasma, a parte líquida, e por suas células de defesa. O plasma é rico em água, cloreto de sódio e bicarbonato, onde nele também se encontra dissolvido o pigmento *hemocianina*, que se apresenta de forma extracelular (Cavalcanti, 2011).

Segundo Obara *et al.* (1992), os invertebrados não sintetizam imunoglobulinas e não possuem o sistema complemento. Sabe-se então que a fagocitose realizada pelas células não é favorecida pelos anticorpos ou componentes do sistema complemento

(Yamamoto & Portinho, 2001), sendo os fatores de defesa dos moluscos, principalmente, as reações de defesa celular, envolvendo fagocitose de materiais estranhos ao organismo—e aquelas relacionadas à defesa humoral, que englobam: lisozimas, lectinas, opsonização (Obara *et al.*, 1992). Embora neste trabalho não tenha sido feita a análise histoquímica dos grânulos, de acordo com Rohr & Amato (2014), as proteínas efetoras atuam na primeira linha de defesa do organismo, sendo sintetizadas basicamente nos hemócitos e armazenadas em seus grânulos.

A defesa imunológica dos moluscos durante uma infecção é mediada por estas células imunes conhecidas por hemócitos, que podem realizar o encapsulamento, fagocitose e liberação de substâncias citotóxicas, sendo essenciais na morte e eliminação dos patógenos invasores (Cavalcanti, 2011). Os hemócitos, que podem estar livres (circulantes na hemolinfa) ou fixos nos tecidos, mobilizam-se em direção às regiões onde aparecem as formas parasitárias, acumulando-se ao seu redor, atacando, formando cápsulas e/ou complexos encapsulantes para a inativação e absorção dos parasitos (*op. cit.*).

Apesar das descobertas sobre o sistema de defesa em moluscos, há ainda, uma indagação sobre a origem dos hemócitos. Jeong *et al.* (1983) consideram que a formação destas células ocorra em um órgão específico, o órgão formador de amebócitos (APO), onde ao estudar sua estrutura em *B. glabrata*, quando não infectada, consistia em pequenos cachos de ameboblastos que se apoiam nas células epiteliais que alinham o pericárdio e ao analisarem o APO sujeito à esquistossomose, observaram uma considerável mudança morfológica, incluindo aglomerados de amebócitos, futuros estágios desta linhagem celular, podendo ser transportados pela hemolinfa. Souza & Andrade (2006), relacionam o APO à medula óssea, ao afirmarem que o órgão realizaria função equivalente, entretanto, apesar dos autores, através da literatura, terem considerado o APO como produtor central de hemócitos, os mesmos não acharam fortes evidências sobre o órgão ser produtor de todos os hemócitos do caracol, pois para tal, teriam que especular que o pequeno órgão central teria que ser sobrecarregado com células quando uma forte resposta contra invasores parasitas estivesse ocorrendo.

Alguns autores, segundo Souza & Andrade (2006), têm sugerido uma origem multicêntrica para os hemócitos, a partir da constatação de mudanças nucleares e até mitose nos hemócitos, indicando sua capacidade de proliferação local, podendo ser destacada a cavidade ventricular do coração, que se mostrou como um local de alta concentração de hemócitos. Durante a análise morfológica das células através do

microscópio óptico, no presente estudo, algumas delas se mostraram, supostamente, em divisão, possivelmente indicando a mitose mencionada pelos autores.

Além da origem, segundo Rebelo *et al.* (2013) apesar de seu papel importante, ainda não existia uma concordância sobre quantos tipos de hemócitos haviam nos moluscos, inclusive a nomenclatura das células varia de acordo com os diferentes autores. Exemplificando, Adamowicz & Bolaczek (2003) as classificam como hemócito I e hemócito II, Rasmussen *et al* (1985) as designam como leucócitos granulares e leucócitos agranulares, respectivamente e diferentemente, Travers *et al* (2008) as nomeiam de grandes e pequenos (imaturos) hialinócitos. Ottaviani (1989) distinguiu os dois tipos diferentes de células como granulócito e hialinócito, caracterizando o primeiro como células maiores, formação dos pseudópodes, aderindo dessa forma ao substrato. Já o outro tipo, hialinócito, como células menores, apesar de também aderência, não foi observado presença de filipodia. Neste trabalho, por uma concordância descritiva com o último autor em relação aos tipos celulares, foi adotada a mesma nomenclatura, sendo ainda necessários estudos futuros, incluindo novas técnicas para uma melhor caracterização dos tipos celulares encontrados na hemolinfa de *A. fulica*, de forma a subsidiar a opção mais assertiva pela nomenclatura a ser adotada.

Atualmente, Wang *et al* (2017), reiteram que os estudos de diferentes hemócitos têm sido estudadas desde 1970, entretanto há uma dificuldade na concordância de consenso que se baseia em dois pontos de vistas: alguns autores defendem que os hemócitos, funcionalmente, são tipos celulares diferentes. Outros são de opinião que seriam um único tipo celular em diferentes estágios de diferenciação (*op. cit.*). A falta de evidência sobre a origem dos hemócitos contribui para o problema, uma vez que nenhuma correspondência entre tipos de hemócitos e ontogenia pode ser feita.

Hine (1999) especulou que talvez os estágios iniciais do desenvolvimento dos granulócitos e estágios finais, mais desgastados, possam ser agranular, dividindo com os hialinócitos esta característica. Carballal *et al* (1997), trabalhando com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET), constataram que alguns granulócitos apresentam pequenos grânulos, e outros contém abundantes grânulos de tamanho maiores. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com essas afirmativas, onde foram encontrados granulócitos pouco desenvolvidos e com poucos grânulos quando comparados com os granulócitos maiores e com grande expansão citoplasmáticas. Esses achados, porém, não poderiam explicar através da variedade morfológica, se seriam estágios de transição das diferentes células ou estágios de desenvolvimento de um único tipo celular.

Rasmussen *et al* (1985) preconizaram que granulócitos pequenos de *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 se tornaram maiores, indicando maturação da célula. Os granulócitos observados no material em estudo, apresentaram tamanhos diferentes, sendo os maiores, apresentando grandes expansões citoplasmáticas, geralmente encontrados nos caracóis adultos, o que poderia explicar sua maturidade. Entretanto, os autores (*op. cit*) não puderam concluir se os granulócitos e hialinócitos seriam estágios diferentes da mesma linhagem celular, sendo o primeiro ativo e o segundo imaturo.

Barracco (1993) defendeu a atividade fagocitária dos granulócitos, e a presença nestas células de fosfatase ácida, uma enzima geralmente encontrada nos lisossomos. Van Der Knaap & Loker (1990) afirmam que os granulócitos digerem os microorganismos invasores após a junção do fagossoma com o lisossoma, onde este último libera suas enzimas e que os hialinócitos são células que, provavelmente, não realizam fagocitose. Sabe-se que os amebócitos denominados granulócitos são os responsáveis pela fagocitose de partículas estranhas, pois o número destas células, bem como sua taxa de fagocitose, aumentou consideravelmente após a infecção das espécies *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 e *Biomphalaria straminea* Dunker, 1848 pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Cavalcanti, 2011).

Travers *et al* (2008) atesta não ter observado uma capacidade fagocitária dos hialinócitos, nem sequer a presença de lisossomos (Barracco *et al.*, 1993).

Os granulócitos são células mais ativas (Foley & Cheng, 1975), sendo provavelmente o glicogênio, um dos envolvidos nesta característica. De acordo com Cheng & Rudo (1976); Rodrick & Ulrich (1984), a degradação de bactérias fagocitadas por granulócitos de moluscos, leva à síntese de glicogênio a partir de açúcares de origem bacteriana dentro da própria célula, sendo usado posteriormente como fonte energética. Travers *et al* (2008) corroborando com essa teoria, supõe que a falta de glicogênio ou lipídeos indicaria a imaturidade celular. Apesar deste trabalho não ter utilizado técnicas capazes de elucidar a histoquímica dos grânulos encontrados somente nos granulócitos, Cavalcanti (2001) acredita serem glicogênio, o que concordaria com a afirmação de Foley & Cheng (1975) e explicaria o motivo de Travers *et al* (2008) não terem visto atividade fagocitária nos hialinócitos.

Barracco *et al*, 1993, descreve os hialinócitos como células esféricas e pequenas, com um grande núcleo central delimitado por uma camada fina de citoplasma. Este hemócito apresenta uma elevada relação núcleo-citoplasma, e ribossomos livres no citoplasma (González & Arenas, 2002). Estas características foram

possíveis de serem observadas no presente trabalho, permitindo dessa forma sua classificação celular como hialinócitos.

Os resultados obtidos no presente estudo, apesar de constituírem o primeiro estudo das células circulantes da hemolinfa de *A. fulica* e elucidarem algumas questões morfológicas, permitindo a identificação preliminar de dois tipos celulares e inferir sobre as possíveis funções no processo de defesa do molusco, não fornece subsídios para elucidar as questões levantadas por vários autores, quanto à origem e função dos hemócitos, uma vez que seriam necessárias investigações nos níveis celular e molecular, de modo a possibilitar maior entendimento sobre os processos de respostas aos agentes estranhos ao molusco.

4.2 - Bioquímica da hemolinfa de *Achatina fulica*

Os estudos sobre o metabolismo bioquímico dos moluscos são importantes para a compreensão de sua fisiologia e podem demonstrar alterações nas vias metabólicas que podem representar estratégias para garantir a sobrevivência (Ferreira, 2006), uma vez que quando os moluscos são submetidos a qualquer estresse ambiental, desencadeiam mecanismos para manutenção da homeostase (Becker, 1980).

Nos gastrópodes pulmonados, o metabolismo energético é baseado em carboidratos, os quais são armazenados na forma do polissacarídeo glicogênio, sendo a glicose o monossacarídeo mais abundante na hemolinfa (Ferreira, 2006; Oliveira 2007).

Brockelman & Sithithavorn (1980), estudando os caracóis gigantes africanos infectados e não-infectados com *Angiostrongylus cantonensis*, observaram uma variação do nível de glicose nos caracóis normais, sendo o valor mínimo 3,95 mg/dL e o máximo 17,91 mg/dL, deste modo, os autores juntamente com Martin *et al.* (1965), concluíram que os níveis de glicose em *A. fulica* são normalmente variáveis. O valor médio de glicose na hemolinfa dos caracóis analisados no presente estudo foi de 4,6 mg/dL, estando, portanto, dentro dos valores considerados pelos autores citados anteriormente.

Na análise da hemolinfa de *A. fulica*, a ureia apresentou valores altos em relação às outras substâncias analisadas. Tal observância pode estar relacionada com a estivação e o composto químico altamente tóxico para as células, a amônia. Hiong *et al.* (2005), reportaram um aumento na síntese da ureia pelos caracóis nos primeiros quatro dias de estivação, apesar dos mesmos concluírem que a mudança fisiológica não se relacionaria com a retenção de água, mas sim que a principal função da síntese da ureia seria a

defesa contra a toxicidade da amônia. Porém, Horne (1971), trabalhando com *Bulimulus dealbatus*, outro molusco pulmonado terrestre, observou que durante períodos de atividade normal do caracol, o nível de ureia na hemolinfa foi quase imperceptível, entretanto, a concentração da substância solúvel em água aumentou durante a estivação, um comportamento definido como uma resposta adaptativa a ambientes caracterizados por temperaturas elevadas, baixos níveis de atividade e uma taxa metabólica drasticamente suprimida, segundo (Salway *et al*, 2010). Esse aumento, de acordo com Horne (1971) seria importante na redução da perda de água.

Horne & Boonkoom (1970), concluíram, portanto, que além de estar associada à desintoxicação da amônia, o acúmulo de ureia pode estar relacionada também com o aumento da concentração osmótica da hemolinfa, sendo importante na retenção de água. O valor elevado da concentração de ureia observado no presente estudo, parece estar de acordo com as conclusões dos autores citados acima, representando, desta forma, uma significância metabólica em moluscos pulmonados.

Achatina fulica, quando em condições adversas, assim como a estivação, pode apresentar uma redução dos principais substratos energéticos, como os carboidratos, o que acarretaria na utilização de outros compostos como fonte alternativa de energia, como as proteínas (Tunholi *et al*, 2013). Brockelman (1978), realizando um estudo sobre os efeitos do parasitismo de *Angiostrongylus cantonensis* na concentração proteica da hemolinfa de *A. fulica*, verificou que os animais normais\não-infectados apresentaram valor médio de 17,7 g/L para proteínas totais e para os infectados a concentração média foi de 6 g/L. O valor médio encontrado neste presente estudo, mostrou-se maior do que o observado no trabalho citado anteriormente, 20,4 g/L, sugerindo que os caracóis analisados no presente estudo estariam sob condições fisiológicas normais.

A análise da ureia na hemolinfa sugere que os animais estariam possivelmente enterrados e entrando em processo de estivação contra períodos quentes e secos, em aspectos biológicos e fisiológicos normais, uma vez que a temperatura média dos três dias que antecederam o dia do experimento foi 32 °C e a umidade relativa do ar média dos mesmos dias foi 72 %. Com relação às dificuldades para realização da pesquisa, a obtenção da hemolinfa foi comprometida pela morte dos caracóis criados no laboratório, entretanto os conhecimentos obtidos através do desenvolvimento deste trabalho devem ser consideravelmente ampliados.

5- CONCLUSÕES

O sistema de defesa interno de *A. fulica*, assim como sua capacidade reprodutiva, hábito alimentar e seu metabolismo bioquímico estão relacionados à sobrevivência do caracol africano nos diferentes locais onde esta espécie exótica invasora se estabeleceu.

Este estudo se constitui no primeiro registro das células circulantes na hemolinfa de *Achatina fulica*.

Este estudo fornece subsídios para que trabalhos futuros elucidem questões sobre a relação do molusco com problemas ambientais, econômicos e de saúde pública.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWICZ, A.; BOLACZEK, M. Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae). **Zoologica Poloniae**, v. 48, p. 93-101, 2003.

ALMEIDA, M. N.; PEREIRA, T. M.; LIMA, L.C.H. Comportamento de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) (Mollusca, Achatinidae) em ambiente urbano. **Revista Biociências**, v. 22, n. 2, Taubaté, SP, 2016.

BARRACCO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 73-83, 1993.

BECKER, W. Metabolic interrelationship of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology Research**, v. 63, n. 2, p. 101-111, 1980.

BERRY, A. J.; CHAN, L. C. Reproductive condition and tentacle extirpation in Malayan *Achatina fulica* (Pulmonata). **Australian Journal of Zoology**, v. 16, n. 5, 1968.

BROCKELMAN, C. R. Effects of parasitism and stress on hemolymph protein of the African giant snail, *Achatina fulica*. **Parasitology Research**, v. 57, n. 2, p. 137-144, 1978.

BROCKELMAN, C. R.; SITHITHAVORN, P. Carbohydrate reserves and hemolymph sugars of the African giant snail, *Achatina fulica* in relation to parasitic infection and starvation. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 62, n. 3, p. 285-291, 1980.

CAETANO, F. A. M. **Estudo comparativo do aparelho reprodutor do molusco *Achatina fulica* criado em cativeiro e asselvajado**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CARBALLAL, M. J.; LÓPEZ, M. C.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 29, n. 2, p. 127-135, 1997.

CARVALHO, R. A. Controle do caracol gigante africano (*Achatina fulica* Bowdich, 1822): ameaça ecológica, sanitária, agrícola e paisagística. **EMEPA**. João Pessoa, JB, 2006.

CHENG, T; C.; RUDO, B. M. Distribution of glycogen resulting from degradation of ¹⁴C-labelled bacteria in the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Invertebrate pathology**, v. 27, n. 2, p. 259-262, 1976.

CHICARINO, E. D. **História de vida e comportamento de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Achatinidae) em condições de laboratório**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juíz de Fora, MG. 2013.

COLLEY, E.; FISCHER, M. L. Avaliação dos problemas enfrentados no manejo do caramujo gigante africano *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) no Brasil. **Zoologia**, v. 26, n. 4, 2009.

CORADIN, L.; TORTATO, D. T. **Espécies exóticas invasoras: situação brasileira**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Brasília, 2006.

CUNHA, M. C. R. Meningite eosinofílica: relato de caso. **RBAC**, v. 49, n. 2, 2017.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R. J. P.; BESSA, E. C. A.; DAEMON, E. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 6, n. 1, Juiz de Fora, MG, 2009.

DURÇO, E. C.; SILVA, L. C.; VARGAS, T. S.; CARRARO, V. M. Conhecimento popular: impactos e métodos de controle de *Achatina fulica* em Valença–RJ, Brasil. **Biotemas**, v. 26, n. 1, 2012.

EDUVIRGEM, R. V.; FERREIRA, M. E. M. C. Dispersão da espécie exótica *Achatina fulica* a partir de seis focos no Município de Maringá, Paraná. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, [S.l.], v. 5, n. 31, set. 2017.

FERREIRA, C. S. **Análise bioquímica e equilíbrio ácido-base em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), sob a exposição ao *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 2006.

FISCHER, M. L. Reações da espécie invasora *Achatina fulica* (Mollusca: Achatinidae) à fatores abióticos: perspectivas para o manejo. **Zoologia**. Curitiba, PR, 2009.

FISCHER, M. L.; COLLEY, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca-Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1, 2005.

FISCHER, M. L.; COSTA, L. C. M. **O caramujo gigante africano *Achatina fulica* no Brasil**. Champagnat Editora, Curitiba, PR, 2010.

FISCHER, M. L.; SIMIÃO, M; S.; COLLEY, E.; COSTA, L. C. M.; RUBIO, G. "Panorama do caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822 no Estado do Paraná: o provável ponto de entrada da espécie invasora no Brasil." I simpósio Brasileiro sobre espécies exóticas invasoras. Brasília, 2005.

FISCHER, M. L.; COSTA, L. C. M.; NERING, I. S. Utilização de recursos alimentares presentes no ambiente antrópico pelo caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, 1822: subsídios para o manejo. **Bioikos**, [S.l.], v. 22, n. 2, fevereiro. 2008.

FOLEY, D. A.; CHENG, T. C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 25, n. 2, p. 189-197, 1975.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.S.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. Methods of enzymatic Analysis, ed Bergmeyer HU. **Academic Press**. New York, NY. v. 4, p. 1794-1798. 1974.

HINE, P. M. The inter-relationships of bivalve haemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 5, p. 367-385, 1999.

HIONG, K. C.; LOONG, A. M.; CHEW, S. F.; IP, Y. K. Increases in urea synthesis and the ornithine–urea cycle capacity in the Giant African Snail, *Achatina fulica*, during fasting or aestivation, or after the Injection with ammonium chloride. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 303, n. 12, p. 1040-1053, 2005.

HORNE, F. R. Accumulation of urea by a pulmonate snail during aestivation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 38, n. 3, p. 565-570, 1971.

HORNE, F.; BOONKOO, V. The distribution of the ornithine cycle enzymes in twelve gastropods. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 32, n. 1, p. 141-153, 1970.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

JEONG, K. H.; LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 2, p. 217-228, 1983.

MARTIN, A. W.; STEWART, D. M.; HARRISON, F. M. Urine formation in a pulmonate land snail, *Achatina fulica*. **Journal of experimental Biology**, v. 42, n. 1, p. 99-123, 1965.

MORENA, P. Angiostrongilíase abdominal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 2, 1988.

NEUHAUSS, E.; FITARELLI, M.; ROMANZINI, J.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, Rio de Janeiro, Feb. 2007.

OBARA, K.; SATTAYASAI, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Ferussac. **The FEBS Journal**, v. 209, n. 1, p. 1-6, 1992.

OLIVEIRA, C. S. Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* bowdich, 1822 (mollusca, gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa de cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. Dissertação. (Mestrado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2007.

OTTAVIANI, E. Selected decrease of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata) after bacteria injection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 45, n. 4, p. 368-369, 1989.

PASCHOAL, S. V.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae): alterations in calcium deposits and in the reproductive function of its first intermediate host. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, n. 2, Curitiba, PR, 1996.

PEREIRA, A. P. M. S.; ROCHA, G. M.; MARTINHO, L. T.; NORTE, N. N. B. O. Meio ambiente e saúde—Estudo de caso: Caramujo africano em Manaus/AM. **I Simpósio Brasileiro sobre Espécies Exóticas Invasoras, Paineis**. Brasília, DF. 2005.

PIMENTEL, D.; McNAIR, S.; JANECKA, S.; WIGHTMAN, C.; SIMMONDS, C.; O’CORNEL, C.; WONG, E.; RUSSEL, L.; ZERN, J.; AQUINO, T.; TSOMODO, T. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. Agriculture, **Ecosystems & Environment**, v. 84, n. 1, 2001.

RASMUSSEN, L. P. D.; HAGE, E.; KARLOG, O. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 45, n. 2, p. 158-167, 1985.

RAUT, S.; BARKER, G. *Achatina fulica* Bowdich and Other Achatinidae as Pests in Molluscs as crop pests, **CAB Publishing**. New Zeland, 2002.

RODRICK, G. E.; ULRICH, S. A. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 37, n. 1, p. 167, 1984.

RODRIGUES, M. V.; JUNIOR, Z. M. F.; MONTEIRO, A. G. Análise do impacto socioambiental do “caramujo africano” no Município de São Gonçalo (RJ). **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 3, 2007.

RODRÍGUEZ, M. C. Estrategia preliminar para evaluar y erradicar *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinaceae) en Ecuador. Boletín Técnico, **Serie Zoológica**, v. 2, Sangolquí, 2006.

ROHR, R. A.; AMATO, S. B. Contribuição para o conhecimento e quantificação dos hemócitos de *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora), Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Zoologia**, v. 104, n. 2, 2014.

SALWAY, K. D.; TATTERSALL, G. J.; STUART, J. A. Rapid upregulation of heart antioxidant enzymes during arousal from estivation in the Giant African snail (*Achatina*

fulica). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 157, n. 3, p. 229-236, 2010.

SARMA, R. R.; MUNSI, S.; ANANTHRAM, A. N. Effect of climate change on invasion risk of giant African snail (*Achatina fulica* Ferussac, 1821: Achatinidae) in India. **PloS one**, v. 10, n. 11. Novembro, 2015.

SOUZA, S. S.; ANDRADE, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 213-218, 2006.

TALKE, H. S. G. E.; SCHUBERT, G. E. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. **Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 174-175, 1965.

TELES, H. M. S.; VAZ, J. F.; FONTES, L. R.; DOMINGOS, M. F. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. **Rev. Saúde Pública** vol. 31 n^o. 3, São Paulo, Junho, 1997.

THIENGO, S. C.; BARBOSA, A. F.; COELHO, P. M.; FERNANDEZ, M. A. Moluscos exóticos com importância médica no Brasil. **I Simpósio Brasileiro Sobre Espécies Exóticas Invasoras**, Brasília. 2005.

TOMIYAMA, K. Homing behaviour of the giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Gastropoda; Pulmonata). **Journal of Ethology**, v. 10, n. 2, p. 139-146, 1992.

TOMIYAMA, K. Age dependency of sexual role and reproductive ecology in a simultaneously hermaphroditic land snail, *Achatina fulica* (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus**, v. 60, n. 4, p. 273-283, 2002.

TOMIYAMA, K. NAKANE, M. Dispersal patterns of the giant african sanail *Achatina fulica* (FERUSSAC) (Stylommatophora: Achatinidae), equipped with a radio-transmitter. **Journal of Molluscan Studies**. v. 59. p. 315-322. July, 1993.

TRIVERS, M. A.; SILVA, P. M.; GOIC, N. L.; MARIE, D.; DONVAL, A.; HUCHETTE, S.; KOKEN, M. PAILLARD, C. Morphologic, cytometric and functional characterization of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. **Fish & shellfish immunology**, v. 24, n. 4, p. 400-411, 2008.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.6, p.24-27, 1969.

TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; THUNHOLI-ALVES, V. M., AMARAL, L. S.; PINHEIRO, J. The influence of starvation on the calcium content in the shell and hemolymph of *Achatina fulica* Bowdich, 1822. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 13, n. 1, 2, 3, 2013.

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

VASCONCELLOS, M. C.; PILE, E. Occurrence of *Achatina fulica* in the Vale do Paraíba, Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 35, n. 6, São Paulo, SP, 2001.

WANG, W.; LI, M.; WANG, L.; CHEN, H.; LIU, Z.; JIA, Z.; QIU, L.; SONG, L. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 67, p. 221-228, 2017.

ZALBA, S. M.; ZILLER, S. R. Propostas de ação para prevenção e controle de espécies exóticas invasoras. **Natureza & Conservação**. v. 5, n. 2. 2007.

ZANOL, J.; FERNANDEZ, M. A.; OLIVEIRA, A. P. M.; RUSSO, C. A. M., THIENGO, S. C. O caramujo exótico invasor *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) no Estado do Rio de Janeiro (Brasil): situação atual. *Biota Neotropica*. Instituto Virtual da Biodiversidade. v. 10, n. 3, Campinas, SP, 2010.