

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

FLAVIA BEZERRA LIMA VERDE

BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Nassarius vibex* (Say, 1822) (MOLLUSCA:
GASTROPODA: NASSARIIDAE) NOS ESTUÁRIOS DOS RIOS CEARÁ E
PACOTI, NORDESTE, BRASIL

FORTALEZA – CEARÁ

2009

FLAVIA BEZERRA LIMA VERDE

BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Nassarius vibex* (SAY, 1822) (MOLLUSCA:
GASTROPODA: NASSARIIDAE) NOS ESTUÁRIOS DOS RIOS CEARÁ E PACOTI,
NORDESTE, BRASIL

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas.

Orientadora: Dra. Cristina de Almeida Rocha-Barreira.

FORTALEZA

2009

FLAVIA BEZERRA LIMA VERDE

BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Nassarius vibex* (SAY, 1822) (MOLLUSCA:
GASTROPODA: NASSARIIDAE) NOS ESTUÁRIOS DOS RIOS CEARÁ E PACOTI,
NORDESTE, BRASIL

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Cristina de Almeida Rocha-Barreira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Helena Matthews-Cascon
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra
Universidade Federal Ceará – UFC

*Aos meus pais Flavio e Tereza,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu a realização das coletas (36 coletas! 18 meses quase intermináveis), livrando a mim e minha equipe de coleta de todos os perigos de trabalhar nas áreas escolhidas. Aos meus pais, Flavio Remo e Tereza Cristina, pelo apoio incondicional aos meus estudos e a todos os aspectos da minha vida. Aos meus irmãos, Aline e Raul, pela companhia. A tia Francisca pelo carinho eterno.

A Rodrigo Rebouças, namorado e amigo, por participar da minha vida, andando na lama do mangue (lembra da sua primeira coleta?), coletando moluscos... Obrigada pela ajuda e pelo apoio nos momentos difíceis.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Cristina de Almeida Rocha-Barreira por ter aceito meu pedido de orientação no mestrado, continuando a parceria iniciada na graduação. Obrigada pelo apoio à idéia do projeto, pelas coletas, por sempre conseguir um tempinho na sua agenda lotada para esclarecer minhas dúvidas.

A Prof^a Dra. Helena Matthews-Cascon (a “matriarca da Malacologia” no Ceará) e ao Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra, por terem aceitado o convite para participar da minha banca de defesa.

A todos os amigos e colegas que ajudaram durante as coletas (depois de 36 coletas a lista de ajudantes ficaria enorme). Um trabalho quase sem fim! Sem vocês esse trabalho não teria sido possível. Um agradecimento especial para Luciana e Valdeana que me presentearam ao realizar uma das minhas coletas quando não pude estar presente, vocês foram demais. Muito obrigada a todos!!

Aos integrantes do Laboratório de Zoobentos do Instituto de Ciências do Mar: Adriana, Alesson, Aline F., Aline Previtera, Diego, Diva, Glauber, Ismália, Karine, Kchrisna, Lígia, Luciana (Lú), Márcia, Mariana, Pedro Henrique, Rafaela (companheira de Congressos de Malacologia), Rossana, Valdeana. Não tem jeito, quem foi do Zoobentos uma vez, não deixa de ser nunca!

Ao Msc. Wilson Franklin que sempre consegue resolver os problemas do laboratório e por agüentar, com muita paciência, as conversas de tantas mulheres em um espaço reduzido.

Ao “povo da histologia” do Zoobentos Ismália, Márcia, Pedro Henrique, Rafaela, Lígia, Mariana e Jenneth pelos momentos de descontração, companheirismo, solidariedade. Foi muito bom trabalhar com vocês e compartilhar os conhecimentos adquiridos.

A grande amiga Ismália, companheira de muitas horas de trabalho e também de descontração. Ao Pedro Henrique (Pedrinho) pela ajuda nas horas de aperreio. Não se preocupem, vou continuar perturbando vocês onde quer que estejamos.

A Karine, minha companhia em quase todas as disciplinas do mestrado, dividindo alegrias e problemas do dia a dia, no contato diário das aulas e do laboratório. Aos colegas do mestrado Cristiane Xerez (foi muito bom ter mais alguém trabalhando com reprodução de gastropoda na turma), Luiz Bezerra (Buda) e Carlos Grossi.

Aos professores do curso de mestrado que contribuíram com a minha formação.

A professora Tereza Cristina Gesteira e aos estagiários do CEDECAM.

As minhas amigas Galyléia, Lidianne, Patrícia, Suellen e Joana que mesmo não estando comigo diariamente estiveram sempre na minha vida.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de mestrado.

Conchas

*Conchas vacías de la arena
que dejó el mar cuando se fue,
cuando se fue el mar a viajar,
a viajar por los otros mares.*

*Dejó las conchas marineras,
pulidas por su maestría,
blancas de tanto ser besadas
por el mar que se fue de viaje.*

***Maremoto
Pablo Neruda***

RESUMO

Nassarius vibex é um gastrópode comum no Nordeste brasileiro que se apresenta em abundância em estuários. A biologia reprodutiva dessa espécie foi estudada a fim de caracterizá-la e verificar a influência das variações ambientais, parasitismo e ocorrência de imposex em duas populações, uma no estuário do Rio Ceará e outra no estuário do Rio Pacoti, Nordeste, Brasil. A precipitação pluviométrica e a salinidade parecem influenciar nas características reprodutivas de *N. vibex*, enquanto a temperatura não apresenta efeito significativo devido a sua pouca variação anual. A espécie apresenta uma população predominantemente feminina, com variações mensais nas proporções, sem haver predominância dos machos em nenhum dos meses. O lábio externo da concha foi utilizado como indicador do estado reprodutivo da espécie, sugerindo que essa característica pode refletir o estado maturativo do animal. As células germinativas de machos e fêmeas foram caracterizadas. As populações analisadas apresentaram parasitismo por trematódeos digenéticos, cestódeos e por outros parasitas não identificados. Análises histopatológicas foram realizadas. Os trematódeos apresentaram efeitos deletérios mais significativos sobre a reprodução de *N. vibex* do que os outros grupos, além de sua presença ter sido numericamente maior. No estuário do Rio Ceará, houve maior diversidade de parasitas, com prevalência reduzida. No estuário do Rio Pacoti, a diversidade de parasitas foi menor, mas as frequências mensais foram mais elevadas. O imposex foi detectado exclusivamente na população do estuário do Rio Ceará. Nessa população, foi registrada a ocorrência de pênis nas fêmeas, formação de vaso deferente, convoluções no oviduto e alterações na massa glandular (glândula da cápsula e de albúmen). Essa última alteração resultou em esterilidade nas fêmeas afetadas, provavelmente em decorrência da presença de cápsulas abortivas. Foram aplicados os seguintes índices para a quantificação do imposex: %I, MPL, FPL, RPLI, VDSI e AOS. O desenvolvimento embrionário e larval da espécie foi determinado. A desova e os estágios de desenvolvimento foram registrados. O período de desova foi registrado nos meses de Junho a Dezembro. *Nassarius vibex* deposita cápsulas ovíferas em substratos duros e as larvas eclodem no estágio de véliger. Foi registrada a ocorrência de cápsulas incubadas no interior do vestíbulo de fêmeas em ambos os estuários e sua relação com as variáveis ambientais e o parasitismo. Mesmo apresentando similaridade entre as duas populações, a determinação de padrões reprodutivos bem definidos para a espécie não foi observada.

Palavras-chave: *Nassarius vibex*, reprodução, desenvolvimento embrionário e larval, imposex, parasitismo, estuário, Rio Ceará, Rio Pacoti.

ABSTRACT

Nassarius vibex is a common gastropod present in abundance in the Northeast estuaries. The reproductive biology of this species was studied to characterize it and verify the influence of environmental variables, occurrence of imposex and parasitism in two populations of the species, one in the Ceará River estuary and the other in the Pacoti River estuary, Northeast, Brazil. Rainfall and salinity seem to influence the reproductive characteristics of *N. vibex*, while temperature has no significant effect due to its low annual variation. The species has a female biased population, with monthly variations, but with no predominance of males in any of the months. The outer lip of the shell was used as an indicator of the species reproductive status, suggesting that this characteristic may reflect the maturity state of the animals. The germ cells of males and females were characterized. The populations examined were parasitized by digenetic trematodes, Cestoda and other unidentified parasites. Histopathological analysis were performed. Trematodes showed more deleterious effects on reproduction than the other groups, and their presence was numerically larger. In the Ceará River estuary there was greater diversity of parasites with reduced prevalence. In the Pacoti River estuary the diversity of parasites was lower, but the monthly rates were higher. Imposex was exclusively detected in the Ceará River estuary population. In this population was reported the occurrence of penis and vas deferens in the affected females, convolutions in the oviduct and changes in the glandular mass (capsule and albumen glands). This last change resulted in sterility in the affected females, probably due to the presence of abortive capsules. The following indices for imposex quantification were applied: % I, MPL, FPL, RPLI, VDSI and AOS. The species embryonic and larval development was determined. The spawning and development stages were recorded. The spawning period occurred between June and December. *Nassarius vibex* deposit ovigerous capsules on hard substrates and larvae hatches at the veliger stage. The occurrence of incubated capsules in the females vestibule was recorded for both estuaries and its relationship with environmental variables and parasitism was analyzed. Even showing similarities between the two populations, the establishment of clearly defined standards for the species was not achieved.

Keywords: *Nassarius vibex*, reproduction, embryonic and larval development, imposex, parasitism, estuary, Ceará River, Pacoti River.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Nassarius vibex</i> em visão ventral e dorsal.....	18
Figura 2 – Áreas de estudo. A . Imagem de satélite do estuário do Rio Ceará, Fortaleza – CE. Fonte: Google Earth, 2008; B. Estuário do Rio Ceará, Fortaleza – CE: banco de lama em uma das margens do estuário; C. Imagem de satélite do estuário do Rio Pacoti, Fortaleza – CE. Fonte: Google Earth, 2008; D. Estuário do Rio Pacoti, Fortaleza – CE: banco de lama em uma das margens do estuário.....	26
Figura 3 – Modo de coleta de exemplares de <i>Nassarius vibex</i> utilizando isca fixada ao sedimento por meio de palito de madeira.....	27
Figura 4 – Índice pluviométrico mensal nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti.....	31
Figura 5 – Salinidade média mensal nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti.....	31
Figura 6 – Temperatura atmosférica média mensal nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti.....	31
Figura 7 – Relação entre a precipitação pluviométrica e a salinidade no estuário do Rio Ceará (ERC) de março de 2007 a agosto de 2008.....	32
Figura 8 – Relação entre a precipitação pluviométrica e a salinidade no estuário do Rio Pacoti (ERP) de março de 2007 a agosto de 2008.....	32
Figura 9 – Proporção esperada e observada para machos e fêmeas no estuário do Rio Ceará.....	34
Figura 10 – Proporção esperada e observada para machos e fêmeas no estuário do Rio Pacoti.....	35
Figura 11 – Variação sazonal do espessamento do lábio da concha (borda) de <i>Nassarius vibex</i> coletados no estuário do Rio Ceará de março de 2007 a agosto de 2008.....	37
Figura 12 – Variação sazonal do espessamento do lábio da concha (borda) de <i>Nassarius vibex</i> coletados no estuário do Rio Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008.....	37
Figura 13 – Relação entre a presença de animais com lábio externo da concha espesso (borda) e incubação de cápsulas pelas fêmeas provenientes do estuário do Rio Ceará de março de 2007 a agosto de 2008.....	38
Figura 14 – Relação entre a presença de animais com lábio da concha espesso (borda) e incubação de cápsulas pelas fêmeas provenientes do estuário do Rio Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008.....	38
Figura 15 – Células da linhagem germinativa masculina de <i>Nassarius vibex</i> . A seta indica a delimitação do folículo masculino. Legenda: ep I – espermátocitos primários; ep II – espermátocitos secundários; epm – espermátides; epz – espermatozóides.....	41

Figura 16 – Células da linhagem germinativa feminina de <i>Nassarius vibex</i> . Legenda: gd – glândula digestiva; og – ovogônias; opv – ovócitos pré-vitelogênicos; ov – ovócito vitelogênico; om – ovócito maduro.....	41
Figura 17 – Variação sazonal do número absoluto de exemplares de <i>Nassarius vibex</i> parasitados por trematódeos digenéticos nos estuários dos Rios Ceará (ERC) e Pacoti (ERP) durante os meses de março de 2007 a agosto de 2008.....	45
Figura 18 – Estruturas reprodutivas secundárias de <i>Nassarius vibex</i> alteradas pelo parasitismo por trematódeo digenético da família Echinostomatidae. A. Macho apresentando vesícula seminal fina e vermelha; B. Fêmeas com massa glandular parasitada apresentando “nuvem” de cercarias. Legenda: bc – bursa copulatória; c – cercarias; esp – esporocistos; mg – massa glandular; v – vestíbulo; vs – vesícula seminal..	45
Figura 19 – Tipos cercarianos registrados em <i>Nassarius vibex</i> coletados nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti. Os organismos não estão na mesma escala. A. Echinostoma cercaria; B. Furcocercous cercaria brevifurca; C. Furcocercous cercaria longifurca; D. Tipo cercariano não identificado; E. Microcercous cercaria; F. Cercariaeum cercaria.....	46
Figura 20 – Secções histológicas de <i>Nassarius vibex</i> evidenciando estruturas parasitadas por trematódeo digenético da família Echinostomatidae. A. Visão geral da gônada e glândula digestiva de um espécime parasitado (40x); B. Detalhe da glândula digestiva com esporocistos imersos na estrutura (100x); C. Gônada feminina apresentando início de infestação por trematódeos. Seta indicando esporocisto (100x); D. Detalhe de um esporocisto em estágio inicial de desenvolvimento (400x); E. Cercaria; F. Metacercaria. Legenda: ec – espinhos cefálicos; gd – glândula digestiva; esp – esporocisto; ov – ovócitos.....	47
Figura 21 – A. Secção histológica de <i>Nassarius vibex</i> evidenciando parasitismo por trematódeos e cestódeo (indicado pela seta; aumento: 100x); B. Detalhe de cestódeo encistado (aumento: 400x). Legenda: td – trematódeo.....	48
Figura 22 – Exemplar de <i>Nassarius vibex</i> coletado no estuário do Rio Ceará parasitado por organismo não identificado. Legenda: gd – glândula digestiva; go – gônada; p – parasitas.....	48
Figura 23 – Macho de <i>Nassarius vibex</i> coletado no estuário do Rio Ceará parasitado por organismo não identificado. A. Animal adulto; B. Visão aproximada da estrutura parasitada; C. Observação dos parasitas ao microscópio óptico; D. Detalhe da porção apical do parasita. Legenda: p – parasitas; pe – pênis; vs – vesícula seminal.....	49
Figura 24 – Estágios de convolução do oviduto em fêmeas de <i>Nassarius vibex</i> . As setas indicam a localização do oviduto. A. Oviduto normal (estágio 0); B. Oviduto em estágio inicial de convolução (estágio 1); C. Oviduto em estágio avançado de convolução (estágio 2).....	52
Figura 25 – Fêmea de <i>Nassarius vibex</i> afetada pelo imposex apresentando características masculinas. Legenda: mg – massa glandular; ovd – oviduto; p – pênis; tc – tentáculos cefálicos.....	53

Figura 26 – Alterações na gônada e oviduto de fêmeas de <i>Nassarius vibex</i> provenientes do estuário do Rio Ceará. A. Fêmea com alterações evidenciando pênis; B. Fêmea com alterações, mas que não possui pênis; C. Fêmeas com massa glandular entumescida; D. Detalhe da massa compacta removida da fêmea representada em C. Legenda: go – gônada; mg – massa glandular; pe – pênis.....	53
Figura 27 – Disposição das cápsulas de <i>Nassarius vibex</i> depositadas na parede do aquário. Imagem do aquário vazio. A seta indica uma das cinco cápsulas depositadas.....	69
Figura 28 – Fotomicrografia de uma cápsula de <i>Nassarius vibex</i> depositada em laboratório. Aumento 40x. Legenda: ae – abertura de escape; bc – base da cápsula.....	69
Figura 29 – Estágios de desenvolvimento embrionário e larval de <i>Nassarius vibex</i> . A. Estágio de ovo; B. Primeira clivagem; C. Estágio de blástula; D. Estágio de gástrula inicial; E. Estágio de gástrula; F. Estágio larval de pré-véliger. G. Estágio de véliger embrionária. H. Véliger recém eclodida. Legenda: c – cílios do vélu; cl – concha larval; es – estatocisto; ma – macrômero; mi – micrômero; op – opérculo; p – pé; v – vélu.....	70
Figura 30 – Correlação entre o índice pluviométrico registrado para o estuário do Rio Ceará e o número de cápsulas depositadas por <i>Nassarius vibex</i> em laboratório.....	71
Figura 31 – Número de cápsulas encontradas no interior do vestíbulo das fêmeas de <i>Nassarius vibex</i> nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008.....	73
Figura 32 – Número de cápsulas encontradas no interior do vestíbulo das fêmeas de <i>Nassarius vibex</i> no estuário do Rio Ceará em relação ao índice pluviométrico entre março de 2007 a agosto de 2008.....	74
Figura 33 - Número de cápsulas encontradas no interior do vestíbulo das fêmeas de <i>Nassarius vibex</i> no estuário do Rio Pacoti em relação ao índice pluviométrico entre março de 2007 a agosto de 2008.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporção sexual de <i>Nassarius vibex</i> no estuário do Rio Ceará durante o período de março de 2007 a agosto de 2008.....	34
Tabela 2 – Proporção sexual de <i>Nassarius vibex</i> no estuário do Rio Pacoti durante o período de março de 2007 a agosto de 2008.....	35
Tabela 3 – Índices de quantificação do imposex em <i>Nassarius vibex</i> provenientes do estuário do Rio Ceará de março de 2007 a agosto de 2008.....	51
Tabela 4 – Medidas dos estágios embrionários e larval de <i>Nassarius vibex</i> provenientes do estuário do Rio Ceará.....	68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
CAPÍTULO 1 – Caracterização gonadal e alterações reprodutivas causadas pelo imposex e parasitismo em <i>Nassarius vibex</i> nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, Nordeste, Brasil	20
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Áreas de estudo.....	24
2.1.1 Estuário do Rio Ceará.....	24
2.1.2 Estuário do Rio Pacoti.....	25
2.2 Procedimentos de campo.....	26
2.3 Procedimentos de laboratório.....	27
2.4 Análise dos dados.....	29
3. RESULTADOS.....	30
3.1 Variáveis ambientais nas áreas de estudo.....	30
3.2 Proporção sexual	33
3.3 Morfologia da concha para determinação do estado reprodutivo de <i>Nassarius vibex</i>	36
3.4 Caracterização das células germinativas.....	39
3.4.1 Linhagem masculina.....	39
3.4.2 Linhagem feminina.....	39
3.5 Influência do parasitismo nas populações estudadas.....	42
3.6 Influência do imposex nas populações estudadas.....	50
4. DISCUSSÃO.....	54
CAPÍTULO 2 – Desenvolvimento embrionário e larval de <i>Nassarius vibex</i> nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, Nordeste, Brasil	61
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Procedimentos de campo.....	64
2.2 Procedimentos de laboratório.....	64
3. RESULTADOS	66

3.1 Caracterização da desova e estágios de desenvolvimento.....	66
3.2 Análise do período de desova.....	71
3.3 Análise das cápsulas incubadas.....	72
4. DISCUSSÃO.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
REFERÊNCIAS.....	82

Introdução Geral

Geograficamente, um estuário é uma região costeira parcialmente fechada, na qual ocorre a mistura da água doce de um rio com a água do mar. Essa região encontra-se fortemente influenciada pela bacia de drenagem do rio. Em regiões equatoriais e tropicais ocorre um tipo de vegetação característica nessas áreas denominada manguezal (SCHMIEGELOW, 2004).

Segundo Miranda *et al.* (2002), os estuários, em condições naturais, são biologicamente mais produtivos do que os rios e o oceano adjacentes devido às altas concentrações de nutrientes que estimulam a produção primária.

As características físico-químicas dos ambientes estuarinos apresentam grandes variações devido ao encontro de águas doce e marinha. A salinidade é o parâmetro ambiental mais variável nesses ambientes, sendo considerada o principal fator abiótico dessas áreas (SCHMIEGELOW *op. cit.*). As flutuações da salinidade são influenciadas pelas variações na maré. Usualmente a salinidade nesses ambientes pode sofrer grandes alterações dentro de um curto período de tempo, além das variações sazonais durante períodos secos e chuvosos (VERNBERG, 1992).

Outros fatores também apresentam grande variação, como o teor de oxigênio e a temperatura da água. As variações constantes dos parâmetros abióticos resultam em uma condição estressante para os organismos que habitam essas áreas e fazem com que estes tenham que possuir adaptações fisiológicas específicas, como por exemplo, aquelas associadas à manutenção do equilíbrio iônico do fluido corpóreo para resistir às flutuações de salinidade (SCHMIEGELOW *op. cit.*).

Geralmente, a água estuarina é turva devido à grande quantidade de partículas em suspensão. O substrato é quase sempre coberto por silte, sendo comuns os fundos lamosos os quais são ricos em detritos orgânicos. O substrato é geralmente anóxico alguns centímetros abaixo da superfície (VERNBERG *op. cit.*).

Segundo Vannucci (2001), os manguezais são ecossistemas marginais bem definidos em espaço com seus limites marcados pelos níveis das marés alta e baixa. Os vários fatores ambientais e sua flutuação determinam a sobrevivência ou morte dos indivíduos de várias espécies.

Nos manguezais, como em outros ecossistemas marginais, a biodiversidade é baixa. Entre os invertebrados, entretanto, há uma abundância relativa e ampla distribuição de moluscos, crustáceos decápodes e insetos de várias ordens (VANNUCCI, 2001).

Os membros do filo Mollusca estão entre os animais invertebrados mais evidentes e familiares e incluem formas diversas como mariscos, ostras, lulas, polvos e caramujos. Em abundância de espécies, os moluscos constituem o maior filo de invertebrados depois dos Arthropoda (RUPPERT; BARNES, 1996; HICKMAN *et al.*, 2004; GLAUBRECHT, 2008).

A classe Gastropoda é a maior classe de moluscos. Estima-se a existência de até 150.000 espécies de Gastropoda, compreendendo até 80% dos moluscos existentes (GLAUBRECHT *op. cit.*). A classificação tradicional de Gastropoda reconhece três subclasses: Prosobranchia, a maior delas, com quase todas as espécies marinhas; Opisthobranchia, um agrupamento que inclui lesmas-do-mar, lebres-do-mar, nudibrânquios, todos marinhos; e Pulmonata, reunindo a maioria das espécies de água doce e terrestre (RUPPERT; BARNES *op. cit.*; HICKMAN *et al. op. cit.*).

A família Nassariidae é composta por gastrópodes de concha pequena, geralmente menor que 25 mm de comprimento, com canal sifonal curto, protoconcha cônica e esculpura. Possui opérculo oval, córneo que não cobre totalmente a abertura da concha. Animais com sifão e tentáculos longos. O pé apresenta dois cirros na porção posterior. Apresentam osfrádio sensitivo bem desenvolvido. Possuem sexos separados, com as fêmeas depositando cápsulas ovígeras. São prosobrânquios gregários, necrófagos e predadores em fundos de areia e lama e habitam preferencialmente águas rasas (RIOS, 1994).

Os nassarídeos apresentam ampla distribuição mundial. No Brasil, várias espécies encontram-se distribuídas desde o estado do Pará até Santa Catarina. Dentre essas espécies destacam-se *Nassarius albus*, *N. antillarum*, *N. capillaris*, *N. karinae*, *N. pernitidus*, *N. scissuratus* e *N. vibex* (RIOS *op. cit.*). No nordeste brasileiro, de acordo com Matthews (1968), na área compreendida entre os estuários dos rios Parnaíba e São Francisco ocorrem três espécies de nassarídeos: *N. vibex*, *N. albus* e *N. nanus*.

Além da sua ampla distribuição, os nassarídeos representam bons modelos experimentais e têm tolerância ambiental elevada (CHAN, 2003; COELHO *et al.*, 2006). São sensíveis à estímulos físicos e químicos, sendo capazes de detectar seu alimento à longas distâncias, consumindo-o em grande quantidade e podendo suportar longos períodos de fome. Possuem grande tolerância a temperaturas elevadas e a baixas concentrações de oxigênio (CHAN, 2003). A maioria dos nassarídeos emerge do substrato ou tornam-se ativos quando o

alimento está disponível dentro do raio de detecção (MORTON; BRITTON, 1991 apud CHAN, 2003).

Nassarius vibex (Figura 1) encontra-se distribuído de Cape Cod até a Flórida, West Indies, Venezuela e Brasil, neste último está distribuído desde o Pará até Santa Catarina. Apresenta concha com dimensões médias de 14 mm de altura por 8 mm de largura, cônico ovalada, com 7 voltas convexas e coloração de esbranquiçada a cinza, usualmente com bandas marrons. Possui escudo parietal bem desenvolvido de coloração branca. Espiral esculturada cruzada por costelas axiais. Lábio externo espessado e dentes internos. Habita bancos de lama e areia em água salobra, alimentando-se de animais mortos (RIOS, 1994). Segundo Matthews (1968), *N. vibex* é bastante comum em todo o nordeste brasileiro, sendo encontrado próximo a estuários, sobre fundos de areia e lama, abundante em pequenas profundidades onde existe matéria orgânica em decomposição, apresentando-se muito ativos mesmo quando expostos durante a maré baixa.



Figura 1 – *Nassarius vibex* em visão ventral e dorsal.

Devido à ampla distribuição geográfica de *Nassarius vibex*, em especial no Nordeste do Brasil, e pelos papéis ecológicos desempenhados pela espécie, esta pesquisa teve como objetivo analisar as características reprodutivas de *N. vibex* em duas populações estuarinas da Região Metropolitana de Fortaleza e comparar como elas se desenvolvem em populações de áreas geográficas próximas. Objetivou-se, também, elucidar a estratégia reprodutiva adotada pela espécie, investigando suas interações com fatores abióticos e bióticos, além de seu desenvolvimento embrionário e larval.

Para tanto, este trabalho está dividido em dois capítulos com o primeiro tratando sobre a “Caracterização gonadal e alterações reprodutivas causadas pelo imposex e

parasitismo em *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, Nordeste, Brasil” e o segundo abordando o “Desenvolvimento embrionário e larval de *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, Nordeste, Brasil”.

Capítulo 1 – Caracterização gonadal e alterações reprodutivas causadas pelo imposex e parasitismo em Nassarius vibex nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, Nordeste, Brasil

1. INTRODUÇÃO

A reprodução é um fenômeno fisiológico que domina todos os processos orgânicos da maioria das espécies. É um processo cíclico que pode ser dividido em três fases: desenvolvimento gonadal, liberação de gametas e fertilização, e desenvolvimento e crescimento. Geralmente, os ciclos reprodutivos consistem de um estágio vegetativo ou de descanso com pouca atividade gonadal, e um estágio reprodutivo iniciado pela gametogênese e seguido pela liberação dos gametas. Os padrões de periodicidade reprodutiva podem ser anuais, semi-anuais ou contínuos durante todo o ano. Para os animais estuarinos que habitam a zona entre marés, a liberação de gametas ou larvas deve ser sincronizada com os ciclos de maré. Em estuários, o local e período em que as larvas são liberadas dependem da sua tolerância às condições do ambiente (VERNBERG, 1992).

No início da gametogênese, todas as partes da gônada estão em estágio similar de desenvolvimento. Com o prosseguimento da gametogênese, nem todas as células gonadais estão em sincronia. Registros indicam que gônadas maduras contêm todos os estágios de gametogênese. Geralmente, com o prosseguimento da maturação da gônada, ovócitos e espermatozoides maduros tornam-se o estágio dominante (WEBBER, 1977).

Na maioria dos prosobrânquios, a atividade gametogênica durante o ciclo reprodutivo é sincrônica em uma população e pode ser dividida em estágios de maturação distintos (WEBBER *op cit.*).

Em prosobrânquios, nos quais a atividade gametogênica é sincrônica em uma população, geralmente há três estágios: um estágio de descanso, um período de ativa gametogênese, e um período no qual a gônada contém gametas fertilizáveis ou aparentemente maduros. O estágio de descanso está provavelmente relacionado a fatores ambientais. A atividade gametogênica não é obrigatoriamente seguida por desova. Em algumas espécies, há períodos nos quais os gametas permanecem aparentemente maduros nas gônadas por até dois

meses. Geralmente, a maturidade gametogênica se correlaciona com o tamanho gonadal máximo (WEBBER, 1977).

Chan e Morton (2005) estudaram três populações de *Nassarius festivus* em Hong Kong e observaram que a espécie completa um ciclo gonadal em um ano. Diferenças no período reprodutivo foram observadas com uma das populações apresentando indivíduos maduros durante seis meses do ano enquanto as outras populações estudadas apresentaram período de maturação de 8-9 meses. Não foi mencionado se houberam diferenças anatômicas de maturação dos órgãos sexuais secundários de machos e fêmeas.

O exame histológico das gônadas de quatro casais em cópula de *Bullia pura* mostrou que os ovócitos estavam no estágio de vitelogênese, mas não completamente maduros, sugerindo o estoque de espermatozóides pela fêmea (MCGWYNNE; VAN DER HORST, 1985).

A reprodução dos organismos pode ser influenciada não somente por variáveis ambientais. O parasitismo e mesmo a exposição a contaminantes podem interferir nos processos biológicos, e, muitas vezes, podem levar a morte dos organismos ou mesmo a alterações significativas na estrutura das populações afetadas.

Em ecossistemas de água salobra, como estuários e lagoas de águas rasas, os trematódeos digenéticos estão difundidos como parasitas de organismos macrozoobentônicos, os quais são hospedeiros intermediários, usando os vertebrados como hospedeiros definitivos (JENSEN *et al.*, 2004).

A característica dos moluscos como hospedeiros de helmintos, podendo abrigar parasitas perigosos para o homem e animais domésticos, é um dos pontos mais relevantes para a importância econômica dos gastrópodes. A ordem de invasão parasitária em gastrópodes pode diferir entre as espécies, podendo ocorrer primeiro na glândula digestiva e após na gônada, ou ao contrário. A reprodução assexuada dos parasitas envolve esporocistos, rédia e cercaria, centenas dos quais são resultantes de um único ovo (FRETTER; GRAHAM, 1962).

A presença de parasitismo em espécies do gênero *Nassarius* já foi reportada por Smith (1971) para *N. obsoletus* e Russel-Pinto e Bartoli (2002) e Russel-Pinto *et al.* (2006) para *N. reticulatus*, relatando a existência de nove espécies de cercaria para esse último hospedeiro. Em *Nassarius vibex*, a ocorrência de parasitas foi registrada por Demaintenon (2001b) e posteriormente por Lima Verde (2007) classificando-os apenas como trematódeos digenéticos.

A redução da fecundidade do hospedeiro é certamente uma resposta muito comum da infestação parasitária. A redução da fecundidade está particularmente associada com infecções em invertebrados que atuam como hospedeiros intermediários ou vetores (HURD, 2001).

Em muitas associações onde a transmissão trófica via cadeia alimentar ocorre, a manipulação adaptativa do hospedeiro pelo parasita pode ocorrer, tornando o hospedeiro mais vulnerável à predação (HURD *op cit.*).

As espécies de nassariídeos constituem um grupo interessante para o estudo de impactos ambientais, pois têm uma ampla distribuição e resistência à poluição (COELHO *et al.*, 2006). Um impacto de grande relevância é o desenvolvimento do imposex em moluscos neogastropodes, síndrome que foi primeiramente descrita por Smith (1971) para *Nassarius obsoletus*. O imposex é caracterizado pelo aparecimento de estruturas sexuais secundárias masculinas em fêmeas afetadas como resultado da exposição desses animais aos compostos orgânicos de estanho presentes em tintas antiincrustantes e outras estruturas que permanecem em contato com a água do mar.

Espécies de nassariídeos são objeto de estudo do imposex em diversos países, sendo a principal delas *N. reticulatus* (BARREIRO *et al.*, 2001; BARROSO *et al.*, 2002a,b; 2005a,b; SOUSA *et al.*, 2005) na Espanha e em Portugal. Mais recentemente, outras espécies estão atraindo atenção para esse tipo de estudo como, por exemplo, *N. kraussianus* na África do Sul (MARSHALL; RAJKUMAR, 2003) e *N. festivus* em Hong Kong (CHAN; MORTON, 2003).

Barroso *et al.* (2005a), estudando o crescimento de *Nassarius reticulatus* em populações de Portugal, descobriram que o imposex nessa espécie começa a se desenvolver no estágio juvenil, como consequência da poluição por TBT, resultando no aparecimento de pênis e vaso deferente em fêmeas jovens, e se desenvolve até a completa maturação da fêmea.

A anatomia do oviduto gonadal foi analisada em fêmeas de *N. reticulatus* na costa da Espanha por Barreiro *et al.* (2001) que observaram a presença de oviduto convoluto em fêmeas apresentando grau elevado de imposex. A presença de fêmeas estéreis, portando cápsulas abortivas no interior da glândula da cápsula, foi reportada para a espécie *Nassarius reticulatus* na Espanha e em Portugal (BARREIRO *et al.*, 2001; BARROSO *et al.*, 2002a; SOUZA *et al.*, 2005). A presença de cápsulas abortivas já foi relatada para outras espécies como *Nucella lapillus* (GIBBS *et al.*, 1987) e *Cantharus cecillei* (SHI *et al.*, 2005).

A presença de pseudo-pênis foi registrada para as espécies *Bullia rhodostoma* e *B. pura*. Não foi registrada a ocorrência de gametas femininos e masculinos no mesmo animal (MCGWYNNE; VAN DER HORST, 1985).

O imposex em *Nassarius vibex* foi primeiramente registrado por Demaintenon (2001a,b) nos Estados Unidos ao realizar estudos ontogenéticos em machos e fêmeas da espécie. No Brasil, o imposex nessa espécie foi registrado por Lima Verde (2006; 2007) para o estuário do Rio Ceará, em Fortaleza, CE e por Cardoso *et al.* (2009) no Rio de Janeiro, RJ. Em *N. vibex*, foram registrados casos de bifalia (ocorrência de dois pênis em um mesmo animal) em fêmeas da praia de Flexeira, no Rio de Janeiro. Duas fêmeas de um total de 69 apresentaram essa característica. Os pênis eram similares em forma, mas diferentes no comprimento (CARDOSO *et al.*, 2009). A ocorrência da bifalia em fêmeas de prosobranquios imposexadas foi primeiramente registrada por Meirelles *et al.* (2007) para *Leucozonia nassa*.

Uma caracterização histomorfológica de *Nassarius vibex*, detalhando principalmente as estruturas do aparelho reprodutor, foi realizada por Demaintenon (2001a; 2001b) e Lima Verde (2007). De acordo com estas autoras, os machos apresentam testículo único, em estreito contato com a glândula digestiva, pênis delgado localizado atrás do tentáculo cefálico direito, vaso deferente e vesícula seminal. O aparelho reprodutor feminino é constituído por ovário, oviduto, glândula ingestora, ducto da glândula ingestora, glândula de albume, glândula da cápsula, vestíbulo, bursa copulatória e poro vaginal.

Tendo em vista a ampla distribuição de *Nassarius vibex* no nordeste brasileiro e os vários fatores que podem interferir na atividade reprodutiva da espécie este trabalho teve como objetivos:

- caracterizar a gônada de machos e fêmeas de *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti;
- avaliar os efeitos do parasitismo na reprodução da espécie em ambos os estuários;
- avaliar os efeitos do imposex na população de *N. vibex* no estuário do Rio Ceará em uma abordagem temporal contínua.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

Foram realizadas coletas mensais durante 18 meses nos estuários dos Rios Ceará (ERC) e Pacoti (ERP) localizados na Região Metropolitana de Fortaleza. A distância entre os dois estuários é de aproximadamente 24km. As coletas foram realizadas entre março de 2007 e agosto de 2008. Em cada estuário, foi selecionado um banco areno-lamoso no qual foram coletados espécimes de *Nassarius vibex* e medidas as variáveis ambientais. A localização dos bancos areno-lamosos foi realizada com um GPS 72 da marca Garmin. A localização georeferenciada do banco areno-lamoso no estuário do Rio Ceará foi S 03°42'02.0"/ WO 38°35'35.3", no estuário do Rio Pacoti as coordenadas foram S 03°48'53.7"/ WO 38°24'38.9".

2.1.1 Estuário do Rio Ceará

O Rio Ceará possui cerca de 60 km de extensão, nasce na Serra de Maranguape e desemboca no Oceano Atlântico. Este rio possui como afluentes fluviais pequenos cursos d'água localizados ao longo de seu percurso, fazendo parte do conjunto de bacias da Região Metropolitana de Fortaleza. O Rio Ceará, em sua desembocadura na divisa de Fortaleza e Caucaia (Figura 2A e 2B), apresenta um manguezal que, segundo Martins (2002), ocupa uma área total de 11,58 km² dos quais 6,75 km² no município de Caucaia e 4,83 km² no município de Fortaleza. Apresenta precipitação pluviométrica anual de 1.642,4 mm, temperatura média de 26,7°C, com mínimas de 21,9 e máximas de 31,6°C (FUNCEME, 2001). A vegetação marginal da área estuarina é composta de mangues, que constituem associações vegetais formadas principalmente por *Rhizophora mangle* Linnaeus, *Laguncularia racemosa* Gaerth, *Avicennia nitida* Jacques, *Avicennia shaueriana* Stapf & Leechman e *Conocarpus erectus* Linnaeus. O Estuário do Rio Ceará apresenta peculiaridades ambientais que o tornam um ambiente com uma área de grande valor ecológico e turístico e cujo manguezal representa um ecossistema de sobrevivência para um grande número de animais (MIRANDA *et al.*, 1988).

2.1.2 Estuário do Rio Pacoti

O Rio Pacoti é o maior curso d'água que atravessa a Região Metropolitana de Fortaleza e abriga uma área de drenagem de 1.359,9 km², com um percurso aproximado de 150 km desde sua nascente na serra de Baturité até a foz (OLIVEIRA *et al.*, 1988). O Estuário do Rio Pacoti (Figura 2C e 2D) abrange uma extensão de 16,4 km entre um ponto próximo à cidade de Aquiraz e a desembocadura a sudeste de Fortaleza. Neste trecho, o leito do rio apresenta característica granulométrica predominantemente areno-lodosa em função da elevada taxa de sedimentação e da presença de extensos cordões de dunas paralelos, em parte do seu percurso. Observações preliminares indicam que o estuário apresenta profundidades moderadas, inferiores a 5 metros. A área estuarina do Rio Pacoti representa um manancial hídrico da mais alta importância para a população local, quer do ponto de vista econômico, quer em termos ecológicos. No que diz respeito à vegetação, as feições mais características são representadas pelo mangue, de fisionomia típica e pela mata subperenifólia, predominantemente arbustiva, com poucas e espaçadas espécies arbóreas (OLIVEIRA *et al.*, 1988).



Figura 2 – Áreas de estudo. A - Imagem de satélite do Estuário do Rio Ceará, Fortaleza – CE. Fonte: Google Earth, 2008; B - Estuário do Rio Ceará, Fortaleza – CE: banco de lama em uma das margens do estuário; C - Imagem de satélite do Estuário do Rio Pacoti, Fortaleza – CE. Fonte: Google Earth, 2008; D - Estuário do Rio Pacoti, Fortaleza – CE: banco de lama em uma das margens do estuário.

2.2 Procedimentos de campo

Em cada estuário analisado, procurou-se coletar um número mínimo de 40 espécimes de *Nassarius vibex* que foram transportados para o Laboratório de Zoobentos do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará para análise. Os animais foram coletados manualmente durante a maré baixa, com auxílio de iscas que consistiram em pedaços de peixe fixadas ao substrato por meio de palitos de madeira (Figura 3).

As variáveis ambientais analisadas consistiram na salinidade da água do leito dos estuários durante a maré baixa e na temperatura do ar dos estuários durante as coletas. As variáveis abióticas de salinidade foram medidas com refratômetro manual portátil modelo RTS-101 ATC - marca Instrutherm, resolução 1% e a temperatura foi medida com

termômetro digital com precisão de 0,5°C. Os dados foram obtidos no momento a coleta, mensalmente, em triplicata para posteriores análises estatísticas.

Os índices pluviométricos mensais utilizados foram obtidos na página virtual da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME). Para o Estuário do Rio Ceará os índices mensais de pluviosidade foram obtidos no posto Pici, enquanto os índices para o Estuário do Rio Pacoti foram obtidos no posto da Fundação Maria Nilva Alves.



Figura 3 – Modo de coleta de exemplares de *Nassarius vibex* utilizando isca fixada ao sedimento por meio de palito de madeira.

2.3 Procedimentos de laboratório

Os animais coletados foram mantidos em aquários de 1000 ml contendo água trazida dos pontos de coleta, com aeração constante, até o processamento. Os animais foram anestesiados com $MgCl_2$ (cloreto de magnésio) salino 7 % por duas horas. Foram realizadas medições da altura e largura da concha com auxílio de paquímetro com precisão de 0,05 mm. As conchas foram removidas com torno mecânico para a análise da morfologia das partes moles dos animais. Foi utilizado microscópio estereoscópico para facilitar a visualização das estruturas corporais. Essas análises consistiram em observações do sistema reprodutivo como grau de desenvolvimento ao longo do período estudado, alterações nos órgãos e presença de parasitas.

Os órgãos femininos analisados macroscopicamente foram: as glândulas da cápsula e de albumen, bursa copulatória, vestíbulo e oviduto. Os órgãos masculinos analisados foram: a vesícula seminal, o vaso deferente e o pênis.

A proporção sexual de *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti foi determinada dividindo-se o número de machos pelo número de fêmeas, de acordo com Chan e Morton (2005).

Após a análise do sexo, uma média de 20 animais em cada estuário estudado foi preparada para o processamento histológico, sendo fixados em Bouin salino por 12 horas e conservados em álcool etílico a 70%. O protocolo histológico realizado consistiu em desidratação em concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Foram realizadas secções transversais dos órgãos com espessura de 5 - 7 μ m e as peças foram coradas com Hematoxilina – Eosina (adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Foram realizados estudos histológicos das gônadas de machos e fêmeas para caracterizar as linhagens de células germinativas nas duas populações. As secções histológicas foram observadas e fotografadas em microscópio binocular com óptica infinita, modelo TNB-04T-PL, marca OPTON, com câmera digital acoplada (modelo DCE-2).

O estudo da variação temporal do imposex na população de *N. vibex* no estuário do Rio Ceará foi realizado através da observação das fêmeas e machos da espécie. Foi registrada a ocorrência de caracteres masculinos como pênis ou papilas, vaso deferente proximal e convolução do oviduto. Os pênis dos machos e fêmeas afetadas foram medidos com papel vegetal milimetrado para o cálculo dos índices de quantificação do imposex como a porcentagem do imposex (%I) e RPLI (Relative Penis Length Index). O RPLI consiste no comprimento médio do pênis das fêmeas x 100/ comprimento médio do pênis dos machos. Este índice é uma adaptação do proposto por Gibbs *et al.* (1987) para *Nucella lapillus* e tem sido amplamente utilizado para a determinação do estágio de desenvolvimento do imposex em moluscos prosobrânquios que apresentam pênis delgado. O VDSI (Vas Deferens Sequence Index) também foi proposto por Gibbs *et al.* (1987) e vem sofrendo adaptações para se ajustar às espécies analisadas. Para as espécies de *Nassarius* utiliza-se a adaptação proposta por Barreiro *et al.* (2001).

Outro índice aplicado foi o AOS (Average Oviduct Stage) descrito em Barreiro *et al.* (2001). Esse índice consiste na classificação em três estágios do grau de masculinização do oviduto das fêmeas. O estágio 0 é usado para fêmeas com oviduto reto normal; o estágio 1 é usado para oviduto apresentando convolução leve a moderada; e o estágio 2 para oviduto bastante convoluto, semelhante à vesícula seminal dos machos da espécie.

Durante os meses analisados, nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti foram analisadas as formas larvais de trematódeos digenéticos encontradas em *N. vibex*. As cercarias foram observadas a fresco ao microscópio óptico, logo que retiradas do molusco hospedeiro. Os tipos cercarianos foram classificados com base na chave de identificação de cercarias proposta por Schell (1970). Análises histológicas foram realizadas para verificar alterações histopatológicas resultantes da presença de estágios larvais das espécies de trematódeos identificadas.

2.3 Análise dos dados

Para analisar a relação entre as variáveis ambientais medidas em campo (temperatura, salinidade e pluviosidade) nos estuários estudados foi utilizado o coeficiente de correlação para postos de Spearman do software STATISTICA for Windows versão 7.0. Esse mesmo teste foi utilizado para verificar a correlação entre a característica de espessamento do lábio da concha de *N. vibex* com as variáveis ambientais. O teste qui-quadrado (χ^2) foi usado para testar a hipótese da igualdade na proporção entre machos e fêmeas (1:1) nas populações dos estuários estudados. Para essa análise foi utilizado o programa estatístico BioEstat.

3. RESULTADOS

3.1 Variáveis ambientais nas áreas de estudo

No estuário do Rio Ceará (ERC), a precipitação pluviométrica durante os meses de março de 2007 a agosto de 2008 foi de 2.312 mm, ressaltando que os dados não estão disponíveis para os meses de agosto a outubro de 2007. Com a precipitação máxima ocorrendo no mês de abril de 2008 com 490,4 mm e a mínima de 5 mm no mês de novembro de 2007. Em fevereiro de 2008, a precipitação registrada foi de 1,8 mm, mas não há registro para todo o mês. No estuário do Rio Pacoti (ERP), a precipitação total foi de 2.281,8 mm durante os meses analisados. A precipitação máxima foi registrada no mês de março de 2007 com 409,6 mm e abril de 2008 com 407,2 mm e a mínima foi registrada no mês de agosto de 2007 com a ausência de precipitação (0 mm). A precipitação mensal para os dois estuários estudados está representada na figura 4.

A salinidade, no estuário do Rio Ceará, apresentou mínima de 2,6 registrada no mês de abril de 2008. Em maio de 2007, a salinidade foi 9. A salinidade máxima registrada foi 39 no mês de agosto de 2008. No estuário do Rio Pacoti, o menor valor de salinidade registrado foi 23 em junho de 2008 e a máxima foi 40,5 em fevereiro de 2008. As médias de salinidade dos estuários estão representadas na figura 5.

Os registros da temperatura média do ar estão representados na figura 6 para os dois estuários durante os meses amostrados. A temperatura do ar mínima registrada para o estuário do Rio Ceará foi 22,6°C em maio de 2008 e a máxima foi 33,6°C em julho de 2008. No estuário do Rio Pacoti, a mínima registrada foi 24,3°C em fevereiro de 2008, com máxima de 34,1°C em julho de 2008.

A salinidade nos estuários analisados apresentou relação inversa com os índices pluviométricos. Os períodos de menor precipitação apresentaram maiores valores de salinidade (Figuras 7 e 8). Embora visualmente exista uma correlação entre esses fatores, a análise de correlação de Spearman não foi significativa para nenhuma das variáveis analisadas havendo apenas uma tendência de correlação negativa entre a pluviosidade e a salinidade no estuário do Rio Pacoti ($r_s = - 0,440996$). Para o estuário do Rio Ceará a correlação foi muito fraca ($r_s = - 0,270126$).

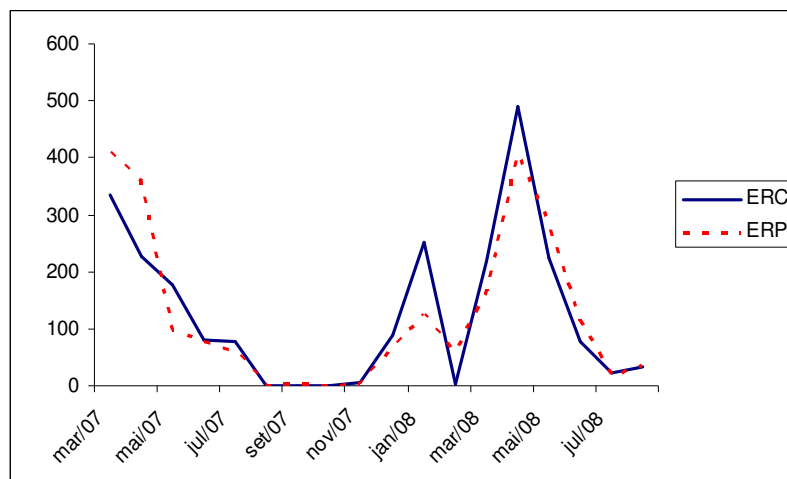


Figura 4 – Índice pluviométrico mensal nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti.

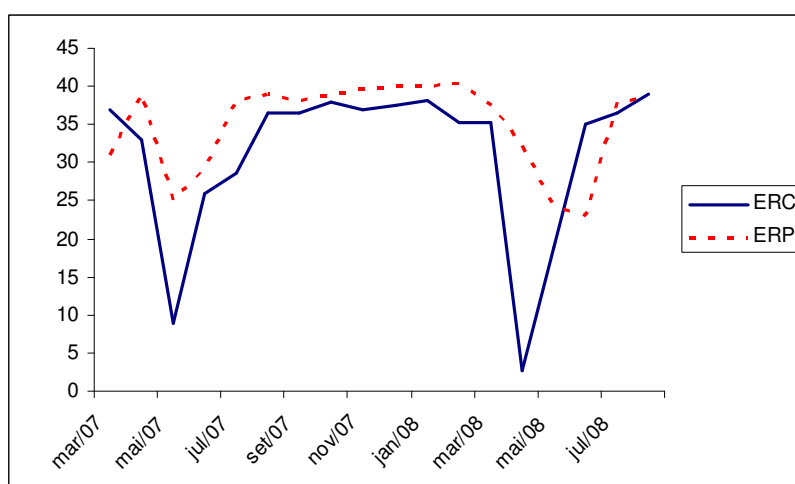


Figura 5 – Salinidade média mensal nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti.

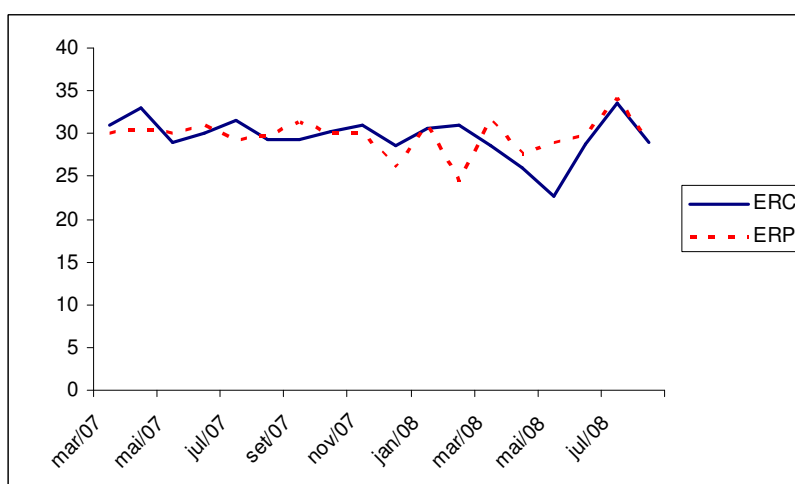


Figura 6 – Temperatura atmosférica média mensal nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti.

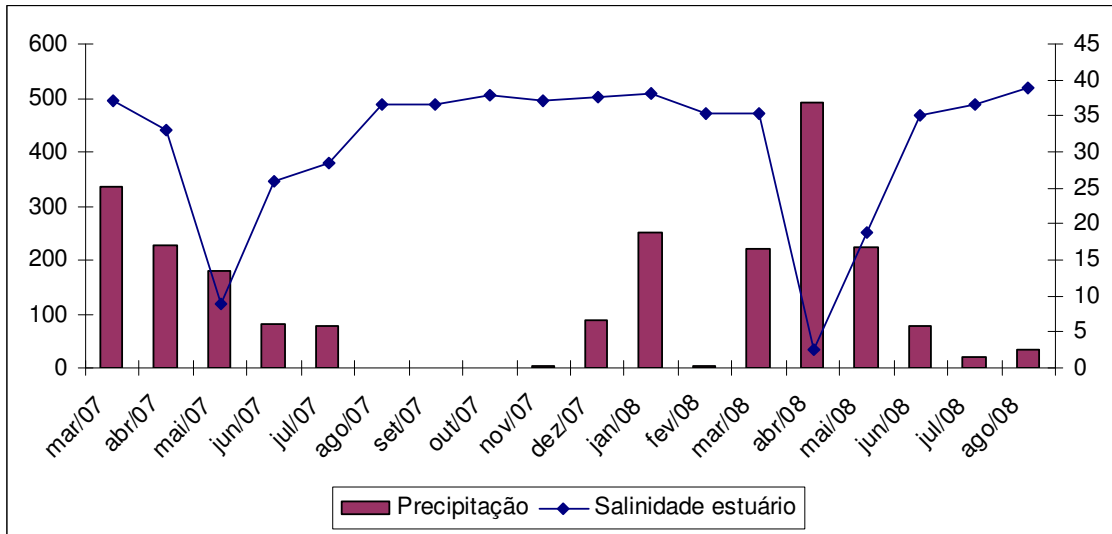


Figura 7 – Relação entre a precipitação pluviométrica e a salinidade no estuário do Rio Ceará (ERC) de março de 2007 a agosto de 2008.

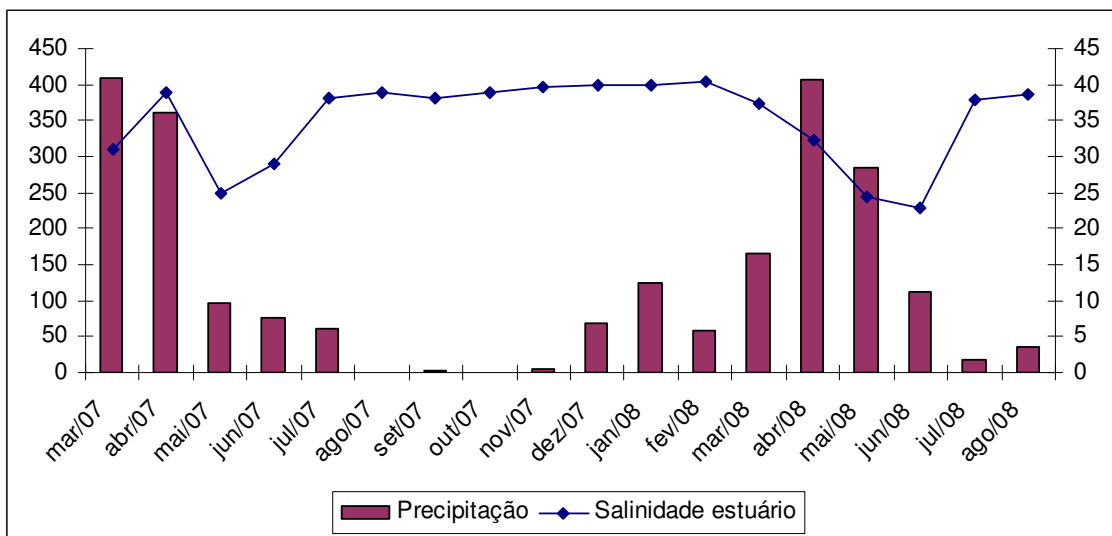


Figura 8 – Relação entre a precipitação pluviométrica e a salinidade no estuário do Rio Pacoti (ERP) de março de 2007 a agosto de 2008.

3.2 Proporção sexual

No estuário do Rio Ceará, foram coletados 705 espécimes de *Nassarius vibex* durante os 18 meses analisados. As frequências e proporções sexuais observadas no período estão representadas na Tabela 1. As fêmeas representaram 52,48% (N = 370) dos animais amostrados, enquanto os machos representaram 38,86% (N = 274), resultando em uma proporção sexual de 0,74: 1. Animais de sexo indeterminado representaram 8,65% (N = 61). O teste do qui-quadrado (χ^2) mostrou um desvio significativo da proporção 1:1 entre machos e fêmeas na população do estuário do Rio Ceará ($\chi^2 = 14.32$, $df=1$, $p = 0.0002$).

Durante os meses de estudo, foram analisados 720 espécimes no estuário do Rio Pacoti. As frequências e proporções sexuais observadas no período analisado estão representadas na Tabela 2. As fêmeas representaram 64,72% (N = 466) dos animais amostrados, enquanto os machos representaram apenas 35,27% (N = 254) da população estudada, resultando em uma proporção sexual de 0,54: 1. O teste do qui-quadrado (χ^2) mostrou um desvio significativo da proporção 1:1 entre machos e fêmeas na população do estuário do Rio Pacoti ($\chi^2 = 62.42$, $df=1$, $p < 0.0001$).

As proporções esperadas e observadas para machos e fêmeas nos estuários analisados estão ilustradas nas figuras 9 e 10.

Tabela 1 – Proporção sexual de *Nassarius vibex* no estuário do Rio Ceará durante o período de março de 2007 a agosto de 2008.

Mês de coleta	Machos	Fêmeas	Indeterminados	Total	Proporção sexual
Mar/07	10	6	24	40	1,66:1
Abr/07	9	20	11	40	0,45:1
Mai/07	18	19	3	40	0,95:1
Jun/07	13	24	3	40	0,54:1
Jul/07	17	22	1	40	0,77:1
Ago/07	16	23	1	40	0,69:1
Set/07	18	22	0	40	0,82:1
Out/07	14	26	0	40	0,54:1
Nov/07	19	21	0	40	0,9:1
Dez/07	16	24	0	40	0,66:1
Jan/08	20	20	0	40	1:1
Fev/08	16	24	0	40	0,66:1
Mar/08	15	22	3	40	0,68:1
Abr/08	9	11	5	25	0,82:1
Mai/08	17	19	4	40	0,89:1
Jun/08	13	24	3	40	0,54:1
Jul/08	16	21	3	40	0,76:1
Ago/08	18	22	0	40	0,82:1

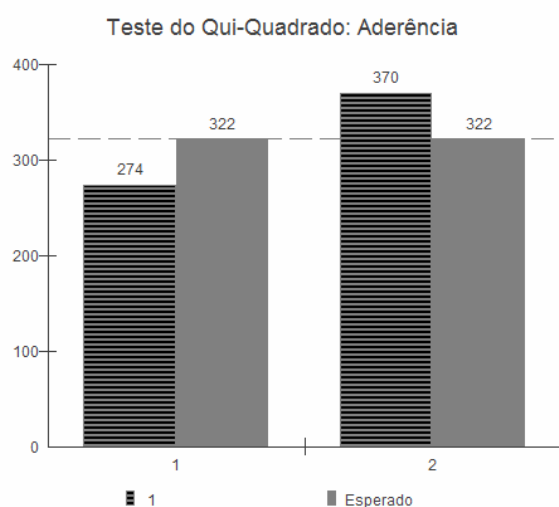


Figura 9 – Proporção esperada e observada para machos e fêmeas no estuário do Rio Ceará.

Tabela 2 – Proporção sexual de *Nassarius vibex* no estuário do Rio Pacoti durante o período de março de 2007 a agosto de 2008.

Mês de coleta	Machos	Fêmeas	Total	Proporção sexual
Mar/07	13	27	40	0,48:1
Abr/07	15	25	40	0,60:1
Mai/07	10	30	40	0,33:1
Jun/07	12	28	40	0,43:1
Jul/07	22	18	40	1,22:1
Ago/07	15	25	40	0,60:1
Set/07	12	28	40	0,43:1
Out/07	12	28	40	0,43:1
Nov/07	16	24	40	0,67:1
Dez/07	13	27	40	0,48:1
Jan/08	18	22	40	0,82:1
Fev/08	11	29	40	0,38:1
Mar/08	10	30	40	0,33:1
Abr/08	20	20	40	1:1
Mai/08	20	20	40	1:1
Jun/08	9	31	40	0,30:1
Jul/08	14	26	40	0,54:1
Ago/08	12	28	40	0,43:1

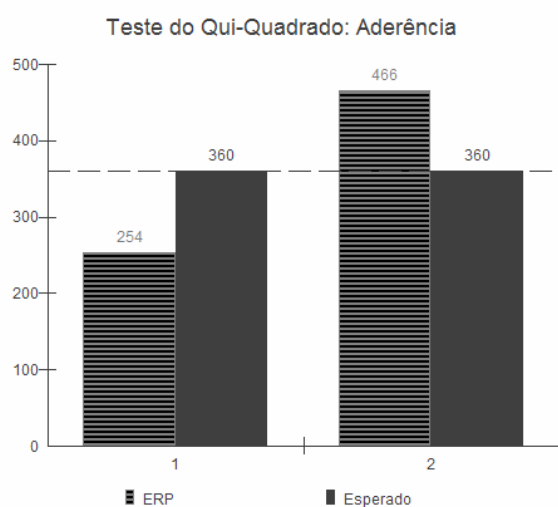


Figura 10 – Proporção esperada e observada para machos e fêmeas no estuário do Rio Pacoti.

3.3 Morfologia da concha para a determinação do estado reprodutivo de *Nassarius vibex*

No estuário do Rio Ceará os exemplares de *Nassarius vibex* amostrados apresentaram altura de concha média de 13,60 mm (DP = 1,26 mm) e largura de concha média de 8,11 mm (DP = 0,79 mm). Já no estuário do Rio Pacoti, a altura média das conchas para os organismos dessa população foi 12,23 mm (DP = 0,73 mm) e a largura média das conchas foi 7,40 mm (DP = 0,47 mm).

Ao longo dos meses de coleta no estuário do Rio Ceará, 67,9% (N = 479) dos animais apresentou o lábio externo da concha espessado (borda da concha), enquanto 32,1% (N = 226) apresentaram o lábio externo fino. Durante os meses de março a junho de 2007 e em abril de 2008, as conchas com lábio fino foram bastante representativas (Figura 11). No estuário do Rio Pacoti, durante o mesmo período, 93,6% (N = 674) dos animais apresentou lábio externo da concha espessado, enquanto apenas 6,4% (N = 46) apresentou lábio fino. Em todos os meses analisados, houve a prevalência de animais com o lábio externo espesso (Figura 12).

Foi observada uma correlação significativa entre o lábio da concha espesso e a precipitação ($r_s = -0,650956$; $p < 0,05$) e entre o lábio espesso e a salinidade ($r_s = 0,656935$, $p < 0,05$) para o estuário do Rio Ceará. O mesmo não ocorreu para o estuário do Rio Pacoti, onde não houve correlações significativas. A temperatura não apresentou correlação com a ocorrência de animais com lábio espessado em ambos os estuários.

As observações da morfologia de *N. vibex* em ambos os estuários analisados mostrou que conchas de lábio fino ocorrem em animais imaturos ou em estágios mais iniciais de maturação. A maioria dos animais com essa característica não apresentou estruturas reprodutivas secundárias bem evidentes, nas fêmeas a massa glandular estava ausente ou bastante reduzida e nos machos a vesícula seminal era pouco proeminente.

A análise de correlação de Spearman para a característica de concha com lábio espesso foi significativa para a ocorrência de fêmeas com cápsulas incubadas no interior do vestíbulo ($r_s = 0,906914$; $p < 0,05$) para a população do estuário do Rio Ceará (Figura 13). A população do estuário do Rio Pacoti não apresentou correlação significativa entre a espessura do lábio da concha e a ocorrência de cápsulas incubadas ($r_s = 0,192823$) (Figura 14). O estudo mais detalhado da incubação de cápsulas está descrito no capítulo 2.

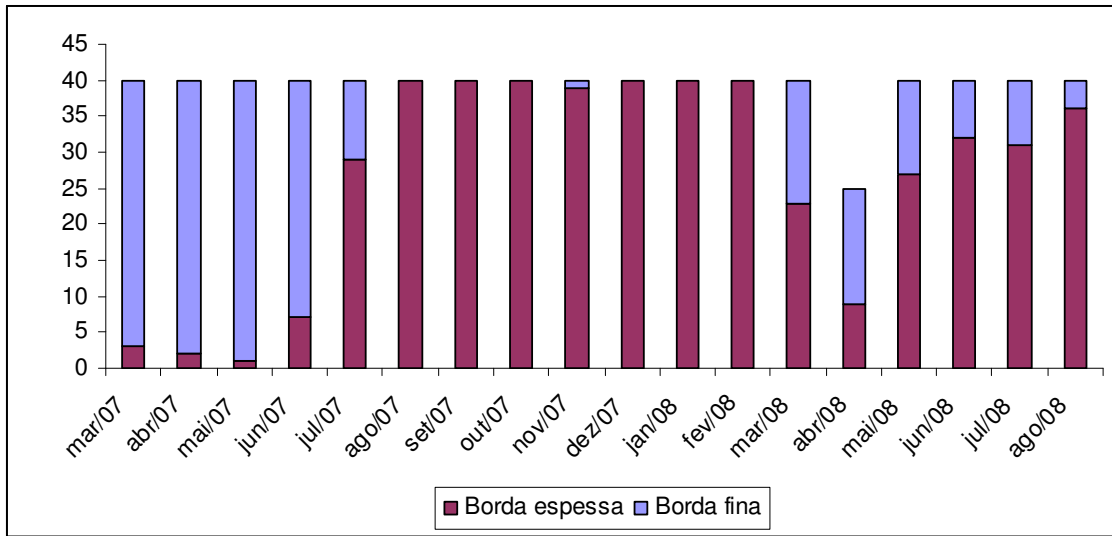


Figura 11 – Variação sazonal do espessamento do lábio da concha (borda) para *Nassarius vibex* coletados no estuário do Rio Ceará de março de 2007 a agosto de 2008.

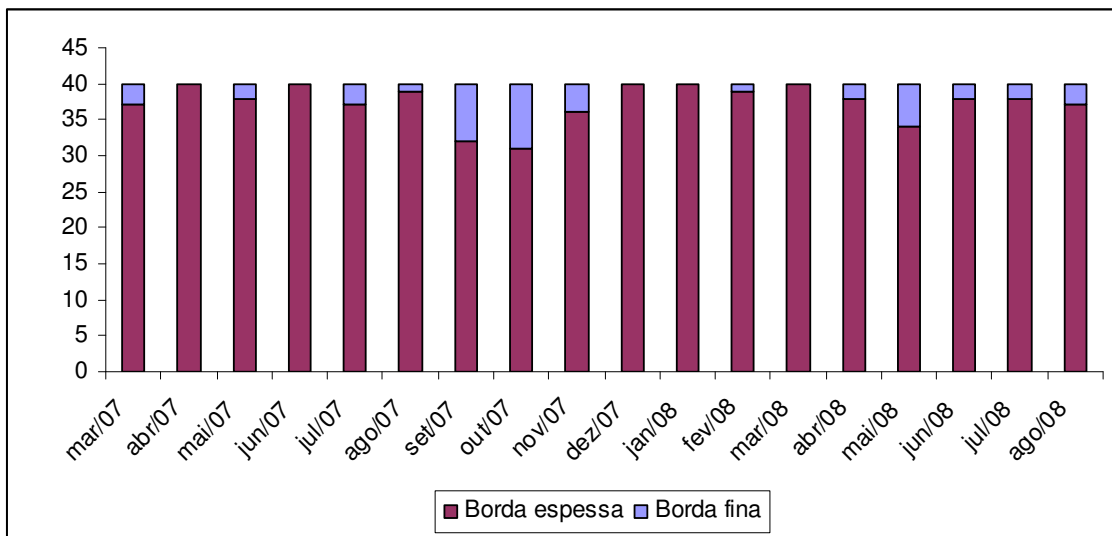


Figura 12 – Variação sazonal do espessamento do lábio da concha (borda) para *Nassarius vibex* coletados no estuário do Rio Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008.

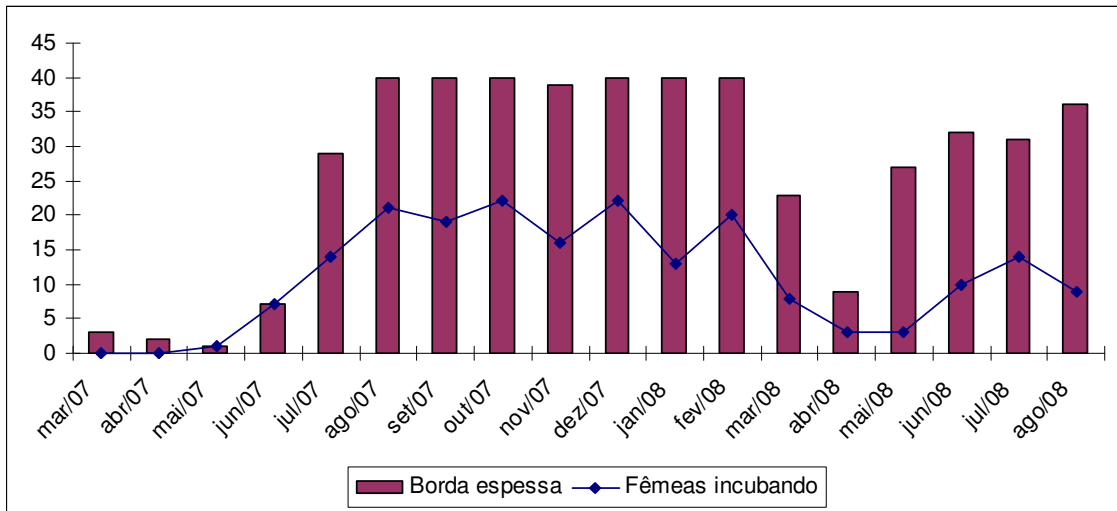


Figura 13 – Relação entre a presença de animais com lábio da concha espesso (borda) e incubação de cápsulas pelas fêmeas provenientes do estuário do Rio Ceará de março de 2007 a agosto de 2008.

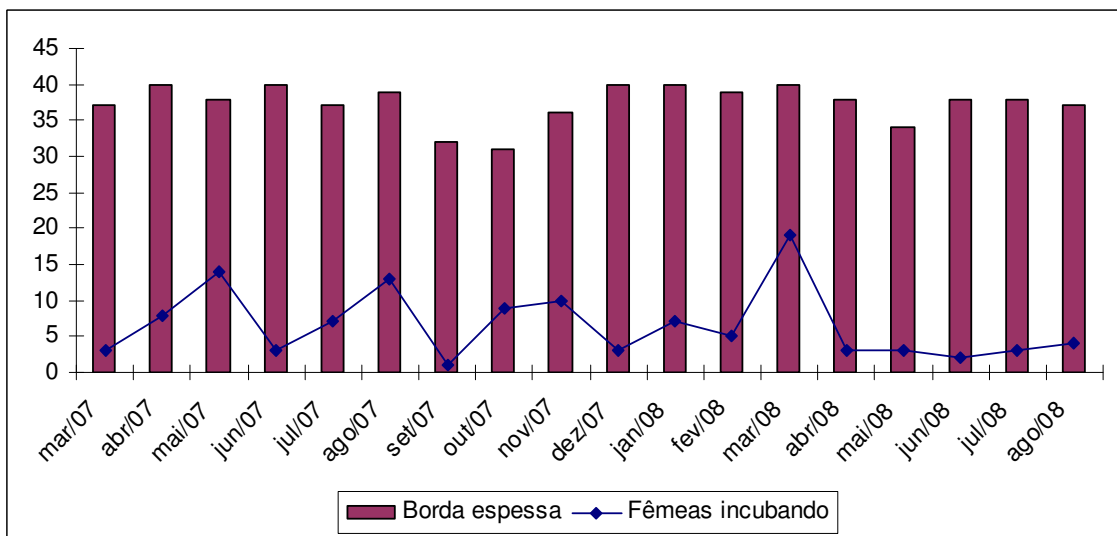


Figura 14 – Relação entre a presença de animais com lábio da concha espesso (borda) e incubação de cápsulas pelas fêmeas provenientes do estuário do Rio Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008.

3.4 Caracterização das células germinativas

Os primeiros estágios da gametogênese ocorrem próximos às paredes dos folículos. Durante os estágios iniciais, o tecido conjuntivo ocupa grande parte da gônada sendo substituído progressivamente por folículos maiores à medida que ocorre o processo maturativo. As gônadas maduras apresentam aumento de tamanho devido ao acúmulo de gametas.

3.4.1 Linhagem masculina

O testículo é formado por um grande número de túbulos separados uns dos outros por finas camadas de tecido conjuntivo. Uma camada germinativa encontra-se na periferia dos túbulos e origina as espermatogônias. As espermatogônias são células pequenas que se dividem mitoticamente em espermatócitos primários. Os estágios mais iniciais do primeiro estágio de espermatócito são caracterizados por um aumento no volume citoplasmático. Os espermatócitos estão ligados principalmente à borda interna do túbulo. Espermatócitos primários sofrem divisões para formar espermatócitos secundários. As espermátides aparecem por divisão reducional a partir dos espermatócitos secundários e depois se diferenciam em espermatozóides maduro, os quais se acumulam no lúmen dos túbulos. As gônadas masculinas maduras são caracterizadas por grande quantidade de espermatozóides (Figura 15).

3.4.2 Linhagem feminina

O ovário está coberto por epitélio cuboidal. É um órgão multitubular delimitado pelos folículos ovarianos os quais estão separados uns dos outros por finas camadas de tecido conjuntivo. Não foi observado tecido de reserva entre os folículos. Em volta da periferia interna de cada folículo há uma camada delgada de epitélio germinativo. As ovogônias aparecem como pequenas células de forma irregular com um núcleo de difícil visualização crescem e se desenvolvem em ovócitos pré-vitelogênicos. Os ovócitos pré-vitelogênicos apresentam núcleo grande, esférico e com um único nucléolo bastante proeminente. O

citoplasma tem forma arredondada e cora-se em roxo com hematoxilina, sendo, portanto, basófilo. Os ovócitos pré-vitelogênicos são encontrados próximos ao epitélio germinativo. O processo de vitelogenese ocorre e grânulos de vitelo são depositados no citoplasma dos ovócitos mais maduros denominados vitelogênicos. Os grânulos de vitelo são pequenos, ovais e corados em vermelho brilhante com eosina. O citoplasma dos ovócitos vitelogênicos em crescimento torna-se granular em aparência com o acúmulo de grânulos de vitelo e há uma mudança para acidofilia, corando-se em rosa com eosina. O núcleo aumenta bastante de tamanho. Os ovócitos vitelogênicos continuam seu processo maturativo e o tamanho dos grânulos de vitelo é enormemente aumentado. Os ovócitos maduros apresentam citoplasma irregular, rico em grandes grânulos de vitelo, núcleo grande e ficam livres no lúmen do folículo (Figura 16).

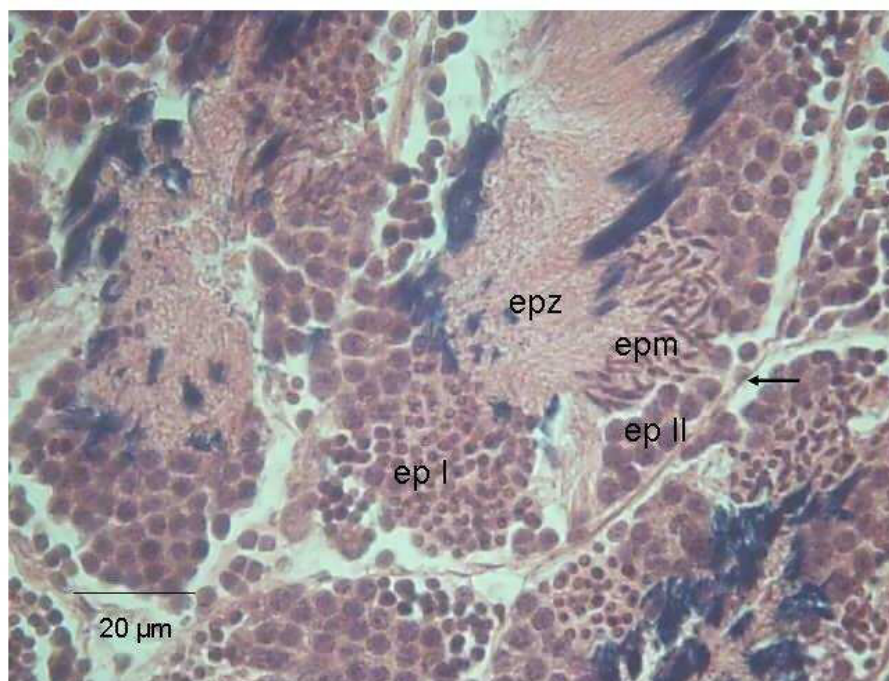


Figura 15 – Células da linhagem germinativa masculina de *Nassarius vibex*. A seta indica a delimitação do folículo masculino. Legenda: ep I – espermatócitos primários; ep II – espermatócitos secundários; epm – espermatídes; epz – espermatozóides.

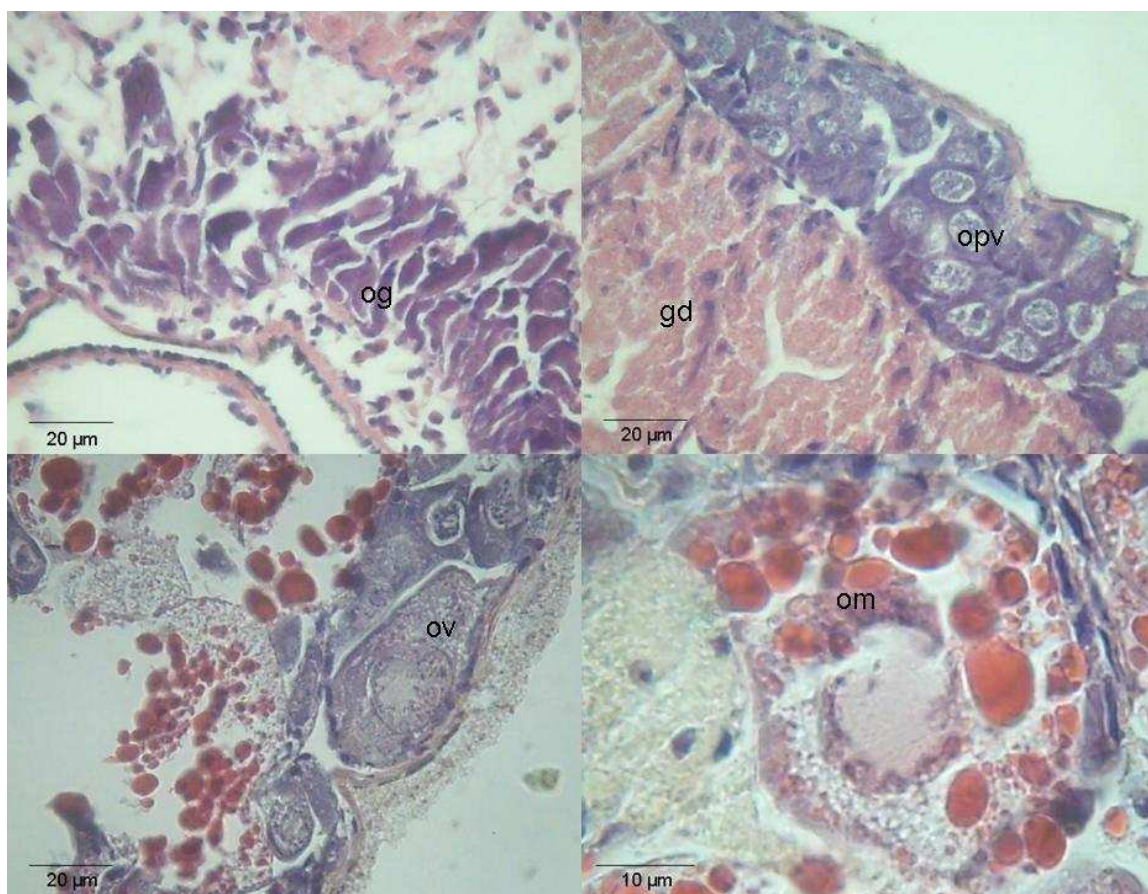


Figura 16 – Células da linhagem germinativa feminina de *Nassarius vibex*. Legenda: gd – glândula digestiva; og – ovogônias; opv – ovócitos pré-vitelogênicos; ov – ovócito vitelogênico; om – ovócito maduro.

3.5 Influência do parasitismo nas populações estudadas

A presença de trematódeos digenéticos em *N. vibex* foi bastante freqüente durante o período de estudo, independente do sexo do animal analisado. Os animais coletados no estuário do Rio Pacoti apresentaram a influência marcante do parasitismo. Foram encontrados organismos parasitados durante todos os meses amostrados. No estuário do Rio Ceará, também houve registro de trematódeos digenéticos, mas sua ocorrência foi mais reduzida (Figura 17). Dos 720 organismos coletados no estuário do Rio Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008, 400 apresentaram evidências macroscópicas de parasitismo (55,5%). Na população de *N. vibex* do estuário do Rio Ceará, 705 animais foram coletados e 29 organismos (4,1%) apresentaram-se parasitados.

Em relação à distribuição dos parasitas entre os sexos, foi observado que as fêmeas representaram 64,75% dos animais parasitados, enquanto os machos representaram 35,25% dos parasitados no estuário do Rio Pacoti. Para o estuário do Rio Ceará, não foi realizada essa quantificação visto que a população de *N. vibex* presente nesse estuário apresenta-se afetada pelo imposex (tema discutido no próximo item), o que dificulta a identificação do sexo.

No estuário do Rio Pacoti, foi registrada a ocorrência de duas espécies de trematódeos, com o predomínio de um único tipo larval o qual ocorreu em proporções elevadas durante todos os meses analisados. No estuário do Rio Ceará observou-se uma freqüência de ocorrência baixa de parasitas embora com uma maior diversidade, com a ocorrência de seis tipos cercarianos. Nos animais coletados no estuário do Rio Ceará não houve a prevalência de nenhum dos tipos cercarianos.

O termo esporocisto será usado neste trabalho para designar o estágio do ciclo de vida do parasita no qual são produzidas as cercarias. O termo será usado indistintamente para esporocistos propriamente ditos e rédias.

Durante os meses analisados foram encontrados os seguintes tipos cercarianos: “*Echinostoma cercaria*”; dois tipos de “*Furcocercous cercaria*” uma longifurca e outra brevifurca com um par de ocelos; “*Microcercous cercaria*”; “*Cercariaeum cercaria*”; e um tipo cercariano com cauda simples e um par de ocelos que não pôde ser classificado (Figura 19).

“*Echinostoma cercaria*” (Figura 19A) possui cauda simples, tão longa quanto o corpo o qual se encontra inteiramente anterior a cauda; ventosas oral e ventral; a ventosa ventral localiza-se na parte central do corpo; a ventosa oral é circundada por um colar de

espinhos, característica distintiva da família Echinostomatidae. Apresenta esporocisto alaranjado e alongado.

“Furcocercous cercaria” brevifurca (Figura 19B) possui cauda bifurcada tão longa quanto o corpo o qual se encontra inteiramente anterior a cauda; apresenta um par de ocelos. O esporocisto é alongado.

“Furcocercous cercaria” longifurca (Figura 19C) possui cauda bifurcada tão longa ou mais longa que o corpo o qual se encontra inteiramente anterior a cauda; apresenta ventosas oral e ventral. O esporocisto é muito longo e afilado.

“Microcercous cercaria” (Figura 19E) apresenta cauda curta, em forma de nó.

“Cercariaeum cercaria” (Figura 19F) não possui cauda, apresenta ventosa oral e ventral. Esporocisto de cor laranja e esférico (aspecto semelhante a um “cacho de uvas”).

A cercaria representada na figura 19D não foi classificada em nenhum dos tipos cercarianos propostos por Schell (1970). Esse parasita possui cauda simples, tão longa quanto o corpo o qual se encontra inteiramente anterior a cauda; apresenta ventosas oral e ventral, com a ventosa ventral na parte mediana do corpo; apresenta um par de ocelos.

Os efeitos do parasitismo por trematódeos digenéticos nos animais afetados resultou na ausência ou na drástica redução de estruturas reprodutivas primárias e secundárias em ambos os sexos. Os parasitas encontraram-se na gônada e principalmente espalhados pela glândula digestiva, tornando-a com aspecto degenerado e coloração laranja, diferindo da coloração encontrada em animais sadios nos quais essa estrutura apresenta coloração verde escura.

Nos machos parasitados, a vesícula seminal apresentou-se reduzida ou ausente, esta, quando presente, possuía coloração vermelha e muito fina (Figura 18A). Alterações no tamanho do pênis dos machos parasitados coletados no estuário do Rio Pacoti foram registradas e evidenciaram a ocorrência de pênis muito pequenos, inclusive a presença de papilas, em animais alguns parasitados. Nas fêmeas, foram encontradas cercarias na glândula da cápsula e de albumen, além do vestíbulo e bursa copulatória (Figura 18B). Foi observado que as fêmeas que estavam parasitadas não possuíam cápsulas ovíferas armazenadas no vestíbulo em nenhum dos meses analisados. Maior detalhamento sobre esse aspecto será exposto no capítulo 2.

Análises histológicas mostraram a distribuição desses parasitas nas gônadas e glândula digestiva de *N. vibex*. Foram observadas alterações histopatológicas severas. A infestação por esses parasitas na gônada resultou na ausência de células germinativas ou sua presença em pequenas quantidades (Figuras 20A, 20B e 20C). Os estágios do ciclo de vida

dos parasitas encontrados na análise histológica foram esporocistos ou rédias, dependendo da espécie do parasita, e cercarias. No interior dos esporocistos e rédias, foram observados diferentes estágios de desenvolvimento desde os mais iniciais (embriões) até cercarias (Figuras 20D e 20E). Foi observada a ocorrência de metacercária de Echinostomatidae no interior da estrutura digestiva (estômago) de um exemplar do estuário do Rio Pacoti (Figura 20F).

Além de trematódeos, foram observadas larvas de cestódeos durante a análise histopatológica. Esses parasitas foram pouco freqüentes nas populações de ambos os estuários e o animal parasitado não apresentava alterações macroscópicas visíveis que pudessem indicar a presença desses parasitas. Em volta da larva encapsulada foi observada reação celular pronunciada no tecido subepitelial. Foi observada a ocorrência de co-infecção por trematódeos e cestódeos em um dos animais analisados (Figura 21).

Outros grupos foram registrados parasitando a glândula digestiva de *N. vibex*. Dois exemplares apresentavam parasitas vermiformes de grupo taxonômico não identificado (Figuras 22 e 23).

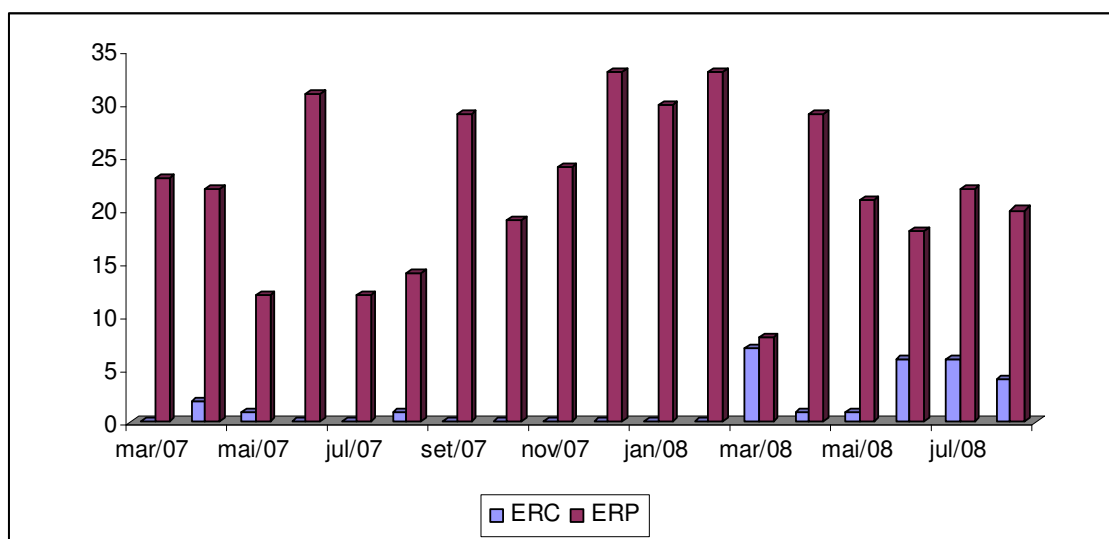


Figura 17 – Variação sazonal do número absoluto de exemplares de *Nassarius vibex* parasitados por trematódeos digenéticos nos estuários dos Rios Ceará (ERC) e Pacoti (ERP) durante os meses de março de 2007 a agosto de 2008.

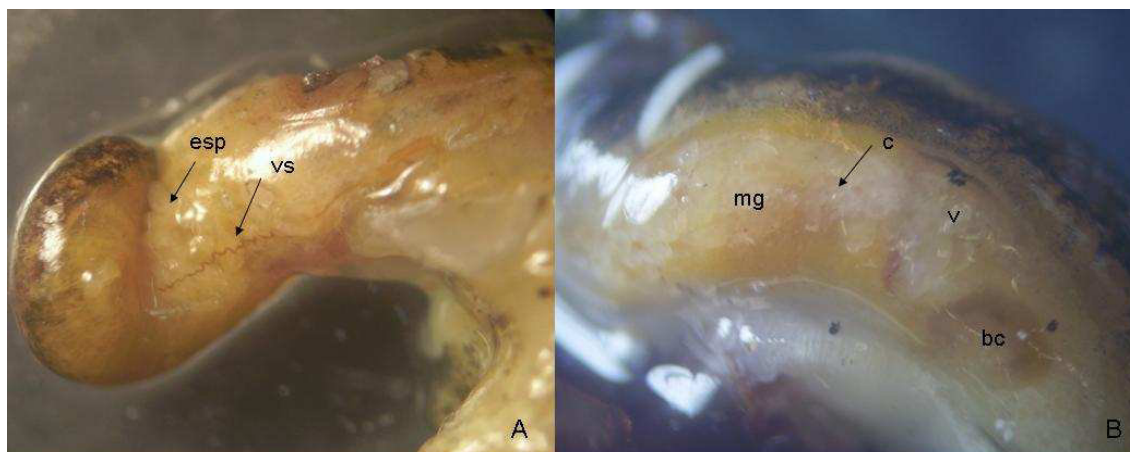


Figura 18 – Estruturas reprodutivas secundárias de *Nassarius vibex* alteradas pelo parasitismo por trematódeo digenético da família Echinostomatidae. A. Macho apresentando vesícula seminal fina e vermelha; B. Fêmeas com massa glandular parasitada apresentando “nuvem” de cercarias. Legenda: bc – bursa copulatória; c – cercarias; esp – esporocistos; mg – massa glandular; v – vestibulo; vs – vesícula seminal.



Figura 19 – Tipos cercarianos registrados em *Nassarius vibex* coletados nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti. Os organismos não estão na mesma escala. A. *Echinostoma cercaria*; B. *Furcocercous cercaria brevifurca*; C. *Furcocercous cercaria longifurca*; D. Tipo cercariano não identificado; E. *Microcercous cercaria*; F. *Cercariaeum cercaria*.

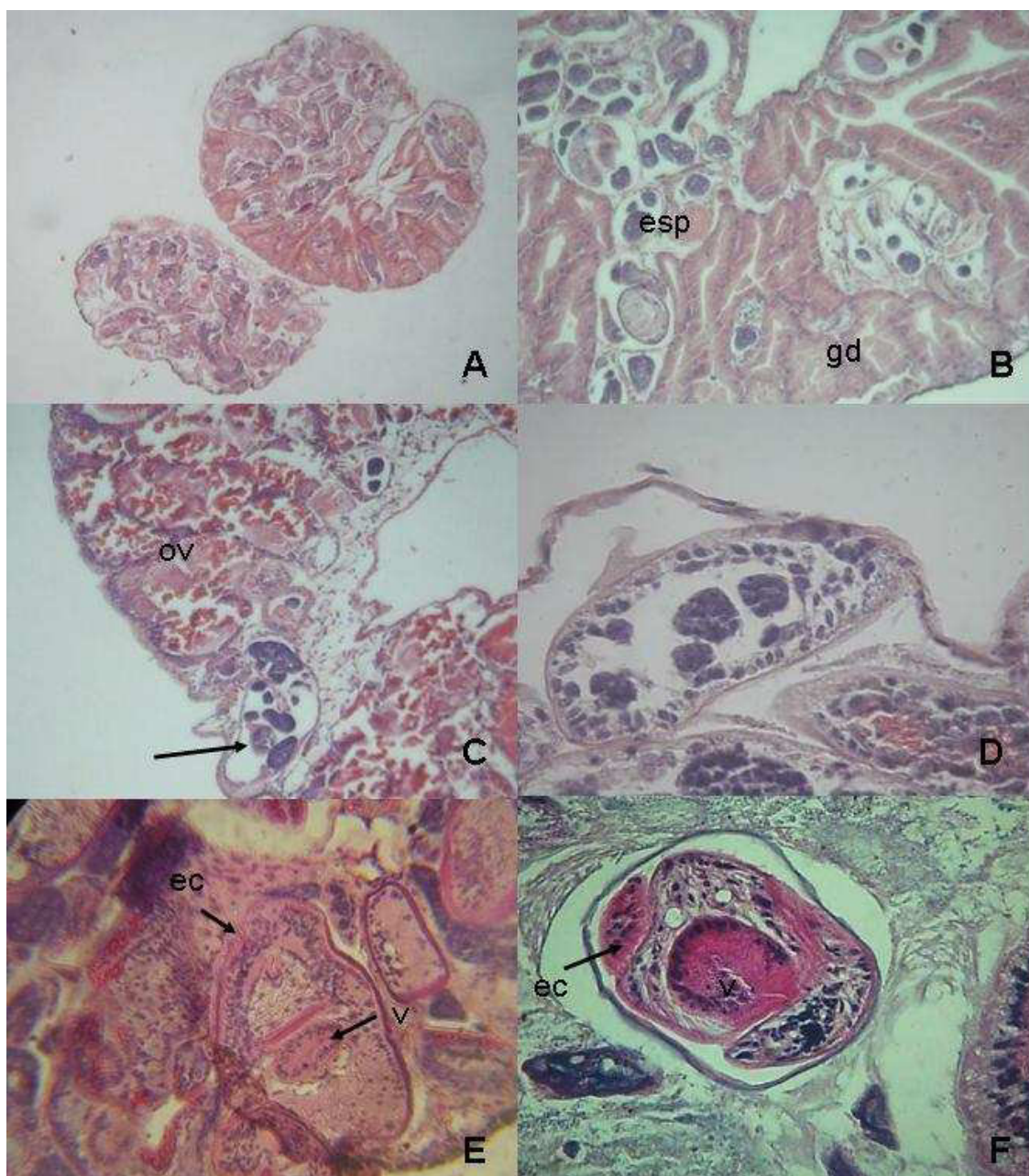


Figura 20 – Secções histológicas de *Nassarius vibex* evidenciando estruturas parasitadas por trematódeo digenético da família Echinostomatidae. A. Visão geral da gônada e glândula digestiva de um espécime parasitado (40x); B. Detalhe da glândula digestiva com esporocistos imersos na estrutura (100x); C. Gônada feminina apresentando início de infestação por trematódeos. Seta indicando esporocisto (100x); D. Detalhe de um esporocisto em estágio inicial de desenvolvimento (400x); E. Cercaria; F. Metacercaria. Legenda: ec – espinhos cefálicos; gd – glândula digestiva; esp – esporocisto; ov – ovócitos.



Figura 21 – A. Secção histológica de *Nassarius vibex* evidenciando parasitismo por trematódeos e cestódeo (indicado pela seta; aumento: 100x); B. Detalhe de cestódeo encistado (aumento: 400x). Legenda: td - trematódeo



Figura 22 – Exemplar de *Nassarius vibex* coletado no estuário do Rio Ceará parasitado por organismo não identificado. Legenda: gd – glândula digestiva; go – gônada; p – parasitas.



Figura 23 – Macho de *Nassarius vibex* coletado no estuário do Rio Ceará parasitado por organismo não identificado. A. Animal adulto; B. Visão aproximada da estrutura parasitada; C. Observação dos parasitas ao microscópio óptico; D. Detalhe da porção apical do parasita. Legenda: p – parasitas; pe – pênis; vs – vesícula seminal.

3.5 Influência do imposex nas populações estudadas

A população presente no estuário do Rio Pacoti não apresentou sinais de que possa estar afetada pela síndrome denominada imposex, ao contrário do que ocorre na população do estuário do Rio Ceará. Nesse estuário, a população de *Nassarius vibex* apresenta-se afetada pelo imposex, provavelmente, em decorrência da presença de dois estaleiros que são as fontes mais próximas dos compostos organoestânicos responsáveis pela ocorrência da síndrome.

O imposex foi caracterizado pela presença de pênis ou papila em fêmeas, formação de vaso deferente e/ou convolução do oviduto. Das 370 fêmeas analisadas no estuário do Rio Ceará, 36,49% (N = 135) apresentaram alguma característica de masculinização. O tamanho médio do pênis dos machos (MPL) foi 6,54 mm (DP = 1,502), enquanto o tamanho médio do pênis das fêmeas (FPL) foi 1,68 mm (DP = 1,499). Os machos apresentaram pênis com variação de tamanho de 1,5 a 10 mm e as fêmeas apresentaram pênis com variação de 0,5 a 5 mm. As papilas não foram medidas, mas as fêmeas foram registradas como afetadas pelo imposex. O RPLI, índice que mede a relação entre o tamanho médio do pênis de machos e fêmeas com imposex, para todos os 18 meses analisados foi 25,7% e variou de 0 a 51,7% (Tabela 3).

A quantificação da formação do vaso deferente em fêmeas com imposex foi realizada por meio do VDSI. A média desse índice para a população foi 1,3. O maior valor mensal registrado de VDSI foi 1,75 nos meses de novembro de 2007 e junho de 2008.

A ocorrência de oviduto convoluto em fêmeas de *N. vibex* (Figuras 24 e 25) foi registrada para 12 espécimes ao longo de todo o período analisado, representando 8,9% das fêmeas afetadas pelo imposex. Em relação à população de fêmeas (sadias e afetadas) as que apresentaram oviduto convoluto representam 3,24% da população. A ocorrência de convoluções no oviduto nem sempre apareceu associada com a ocorrência de pênis e vaso deferente. Algumas fêmeas em estágio 1 (oviduto apresentando convolução leve a moderada) não apresentaram essas estruturas masculinas. Apenas uma fêmea apresentou estágio 2 (oviduto bastante convoluto), essa estrutura apresentou-se muito semelhante à vesícula seminal dos machos da espécie, diferindo apenas na coloração. A vesícula seminal dos machos, quando cheia de espermatozoides, apresenta coloração branca, nesta fêmea, o oviduto estava repleto de ovócitos e apresentou-se amarela. Uma única fêmea com oviduto convoluto apresentou as estruturas da massa glandular alteradas e cinco estavam incubando

cápsulas ovígeras com embriões e larvas véliger viáveis. O índice que mede a masculinização do oviduto na população (AOS) foi 0,11 para todos os meses analisados. O AOS máximo foi 0,5 registrado em julho de 2008 e o mínimo foi 0, registrado para nove meses do período de estudo.

Outra alteração apresentada pelas fêmeas de *N. vibex* no estuário do Rio Ceará ocorreu na massa glandular (Figura 26). Morfologicamente, essa estrutura apresentava-se rígida, com coloração escura, diferindo das encontradas em fêmeas sadias cuja coloração varia de branco leitoso a amarelo/alaranjado. Dentro dessas estruturas, foram encontradas massas compactas de coloração marrom que ocupavam todo o espaço da massa glandular. Oito fêmeas apresentaram essas alterações. Algumas delas apresentaram pênis e vaso deferente, outras não apresentaram nenhuma dessas estruturas. A análise histológica das gônadas revelou grande quantidade de vitelo e uma aparente desorganização dos folículos.

Tabela 3 – Índices de quantificação do imposex em *Nassarius vibex* provenientes do estuário do Rio Ceará de março de 2007 a agosto de 2008.

Mês	Fêmeas imposex	% Imposex	MPL (mm)	Desvio padrão	FPL (mm)	Desvio padrão	RPLI (%)	VDSI	AOS
mar/07	1	16,67	5,556	1,467	1	0	18	1	0
abr/07	0	0	4,722	1,394	0	0	0	0	0
mai/07	15	78,9	5,611	1,29	2,75	3,182	49	1,27	0
jun/07	14	58,3	5,654	1,329	0,317	0,371	5,6	1,5	0
jul/07	11	50	6,382	1,18	1,5	14,142	23,5	1,18	0,18
ago/07	14	60,9	7,938	1,328	2,75	1,554	34,6	1,57	0,07
set/07	7	31,8	7,111	1,53	1,833	1,258	25,8	1,57	0
out/07	9	34,6	6,393	0,924	1,75	1,768	27,4	1,1	0
nov/07	4	19,05	7,737	1,195	4	0,707	51,7	1,75	0
dez/07	6	25	7,031	1,132	1,167	0,764	16,6	1,5	0
jan/08	2	10	6,9	1,199	0	0	0	1	0,5
fev/08	4	16,7	7,156	0,889	3	0	41,9	1	0,25
mar/08	11	50	5,867	2,125	2,25	2,475	38,35	1,64	0,27
abr/08	5	45,45	6,889	1,318	1	0	14,5	1,6	0,2
mai/08	9	47,4	6,75	1,571	0,5	0	7,4	1,3	0,11
jun/08	8	33,3	6,423	1,058	1,833	1,893	28,5	1,75	0
jul/08	5	23,8	5,766	0,842	0,5	0	8,67	1,2	0,4
ago/08	10	45,45	6,278	1,629	1,25	1,061	19,9	1,6	0,1
TOTAL	135	36,49	6,542	1,502	1,68	1,499	25,7	1,3	0,11

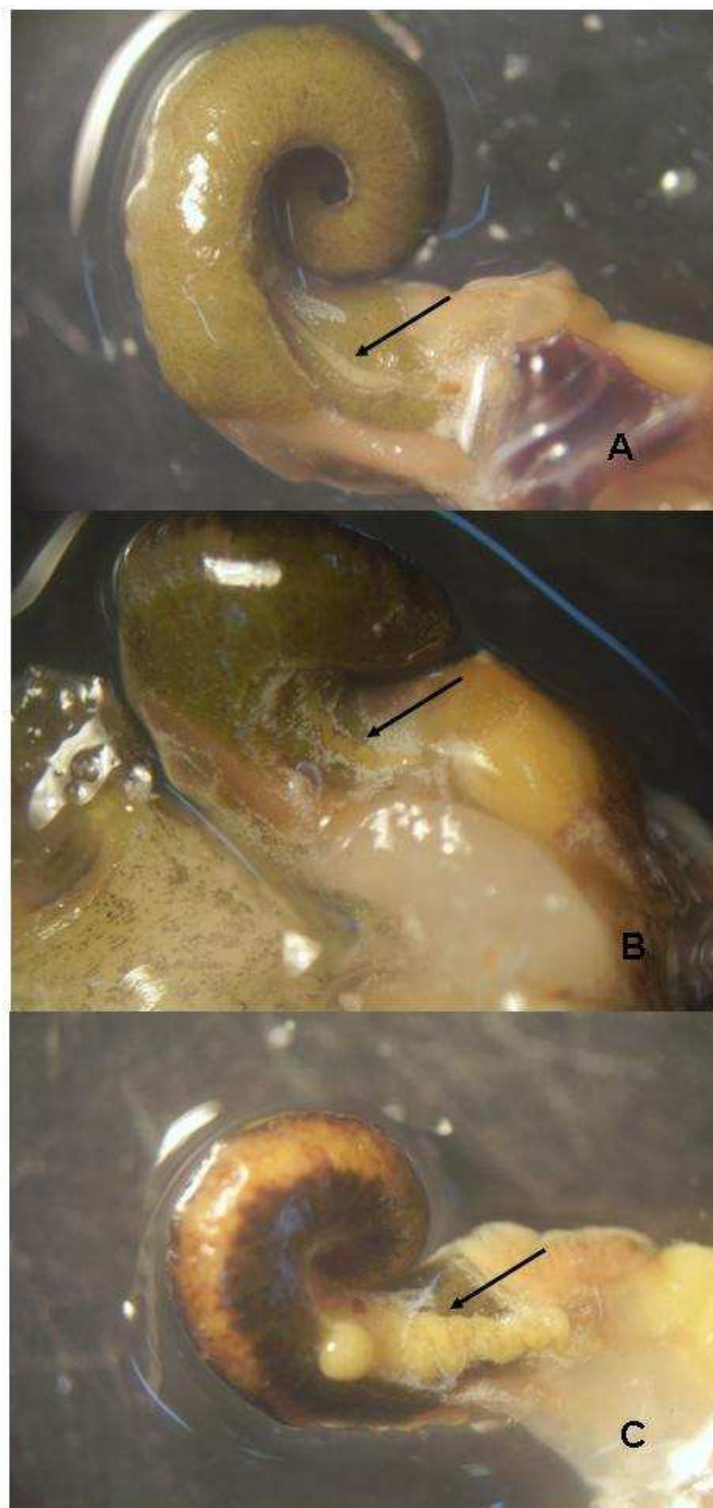


Figura 24 – Estágios de convolução do oviduto em fêmeas de *Nassarius vibex*. As setas indicam a localização do oviduto. A. Oviduto normal (estágio 0); B. Oviduto em estágio inicial de convolução (estágio 1); C. Oviduto em estágio avançado de convolução (estágio 2).

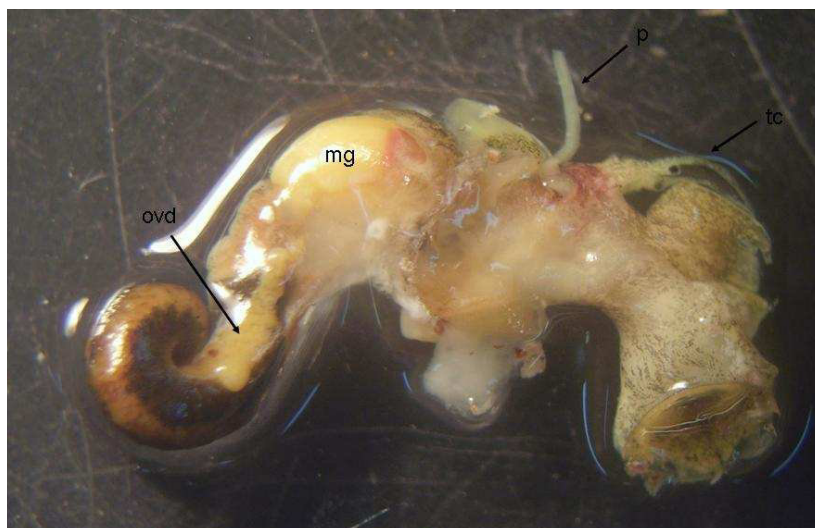


Figura 25 – Fêmea de *Nassarius vibex* afetada pelo imposex apresentando características masculinas pênis e oviduto convoluto. Legenda: mg – massa glandular; ovd – oviduto; p – pênis; tc – tentáculos cefálicos.

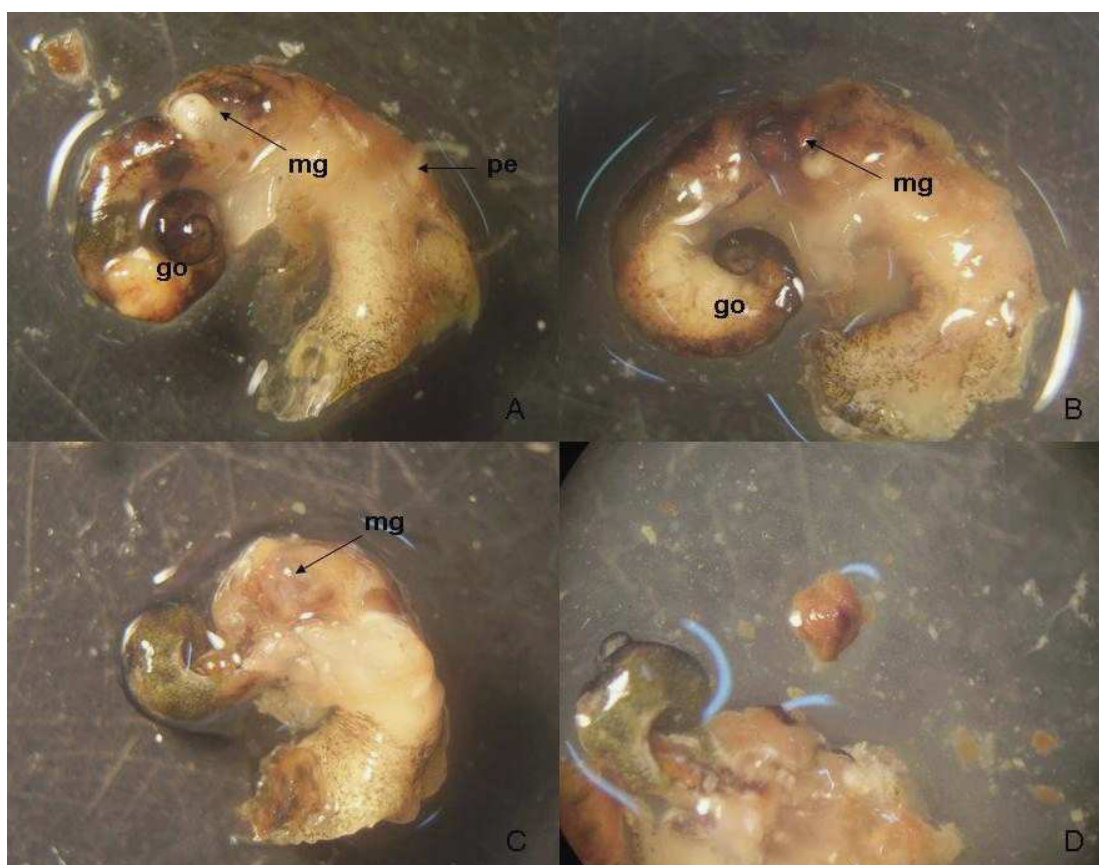


Figura 26 – Alterações na gônada e oviduto de fêmeas de *Nassarius vibex* provenientes do estuário do Rio Ceará. A. Fêmea com alterações evidenciando pênis; B. Fêmea com alterações, mas que não possui pênis; C. Fêmeas com massa glandular entumescida; D. Detalhe da massa compacta removida da fêmea representada em C. Legenda: go – gônada; mg – massa glandular; pe – pênis.

4. DISCUSSÃO

Os meses mais chuvosos foram de março a maio em ambos os anos de coleta nos dois estuários analisados, que caracterizam a quadra chuvosa no estado do Ceará.

A salinidade dos estuários apresentou-se alta durante a maior parte dos meses analisados, tendo sido reduzida apenas no período de maior pluviosidade. Em ambos os estuários pôde ser observada essa redução de salinidade, mas no estuário do Rio Ceará essa redução foi mais acentuada do que a ocorrida no estuário do Rio Pacoti. Essa diferença pode ser resultado do maior aporte de água doce proveniente de galerias pluviais no estuário do Rio Ceará.

A temperatura atmosférica durante o período analisado mostrou-se constante, como o esperado para a região Nordeste onde os estuários analisados estão inseridos. As temperaturas mais baixas durante o período de estudo foram registradas em dias nublados, não sendo características do período.

As populações de *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti apresentaram desvio significativo da razão de 1:1 entre machos e fêmeas. As populações estudadas apresentaram-se compostas principalmente por fêmeas, diferindo do registrado por Cardoso *et al.* (2009) para a mesma espécie. Esses autores verificaram que a população presente na praia de Flexeiras, no Rio de Janeiro, estava composta por 55,48% de machos e 44,52% de fêmeas. Já para três espécies de *Bullia* (*B. digitalis*, *B. pura*, *B. rhodostoma*), a razão sexual mensal mostrou-se muito similar, com as fêmeas geralmente dominando as proporções (MCGWYNNE; VAN DER HORST, 1985).

Em populações de *Nassarius festivus* em Hong Kong, a proporção sexual entre machos e fêmeas difere significativamente da razão 1:1 apresentando predominância de fêmeas nas três áreas analisadas (CHAN; MORTON, 2005) e assim como nas populações estudadas nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, apresentam diferenças nas proporções entre as áreas. Torres e Drummond (1999 apud CHAN; MORTON, 2005) sugerem que, em condições reprodutivas favoráveis, a razão sexual se aproxima de 1:1. Em condições ambientais deterioradas, a diferença entre a proporção dos sexos pode aumentar. Relacionando esse conceito com as populações de *N. vibex* pode-se dizer que a população presente no estuário do Rio Ceará (0,74:1) estaria sob condições ambientais mais favoráveis que as do estuário do Rio Pacoti (0,54:1).

Matthews (1968) observou espécimes de *Nassarius vibex* com concha de até 18 mm de comprimento no nordeste brasileiro. Demaintenon (2001a), estudando populações da espécie no sudeste dos Estados Unidos, observou que esta alcança o tamanho adulto em torno de 15 mm.

No estuário do Rio Ceará, a população de *N. vibex* apresentou altura de concha média de 13,60 mm e largura de concha média de 8,11 mm. No estuário do Rio Pacoti, as médias das medidas das conchas foram um pouco inferiores, com altura igual a 12,23 mm e largura igual a 7,40 mm. Rios (1994) citou medidas de conchas de 14x8 mm, portanto maiores que as encontradas nos estuários analisados. Uma população de *N. vibex* do Rio de Janeiro apresentou tamanhos médios de concha mais semelhantes aos do presente trabalho, com a altura da concha dos machos igual a 12,89mm e a altura da concha das fêmeas igual a 12,87mm, não havendo diferença significativa entre os sexos. As fêmeas de três espécies de *Bullia* apresentam maiores comprimentos de concha que os machos (MCGWYNNE; VAN DER HORST, 1985).

O lábio externo da concha foi utilizado como indicador do estado reprodutivo da espécie, sugerindo que essa característica pode refletir o estado maturativo do animal.

Nos dois estuários, em todos os meses analisados, houve a prevalência de exemplares de *Nassarius vibex* com o lábio externo espesso. Barroso *et al.* (2005a) observaram em *N. reticulatus* que o lábio da concha apresenta variações pronunciadas na sua forma relacionadas ao tamanho do animal e às estações do ano (variáveis ambientais). De acordo com esses autores, nessa espécie, a temperatura da água tem importante papel nessa característica, visto que durante os meses de inverno os animais apresentam a borda da concha espessada e durante o verão o lábio torna-se fino.

Pode-se inferir que no estuário do Rio Ceará, durante os meses do primeiro semestre do ano, *N. vibex* aloca recursos no crescimento e apresenta o lábio externo da concha fino. Durante esse período, não ocorre um investimento acentuado na reprodução. No segundo semestre, os animais reduzem o crescimento e investem recursos na reprodução.

Enquanto na população do estuário do Rio Ceará foi observada correlação entre o espessamento do lábio e a precipitação, no estuário do Rio Pacoti essa correlação não foi observada. Nessa população, outros fatores podem estar envolvidos como a presença de parasitas.

Helminhos parasitas de moluscos incluem trematódeos, cestódeos e nematódeos (e em menor extensão acantocéfalos, turbelários e nemérteos) e podem debilitar seus

hospedeiros, causando crescimento reduzido e redução na fecundidade (SINDERMANN, 1990).

A ocorrência de trematódeos digenéticos como parasitas em gastrópodes é bastante comum, principalmente em ambientes estuarinos. Estes moluscos são, principalmente, hospedeiros intermediários e abrigam os estágios larvais desses trematódeos.

A presença de trematódeos digenéticos em *Nassarius vibex* foi bastante freqüente durante o período de estudo. Os animais coletados no estuário do Rio Pacoti apresentaram a influência marcante do parasitismo. Foram encontrados organismos parasitados durante todos os meses amostrados. No estuário do Rio Ceará também houve registro de trematódeos digenéticos, mas sua incidência foi mais reduzida.

Em relação à distribuição dos parasitas entre os sexos, foi observado que as fêmeas apresentaram-se mais parasitadas que os machos no estuário do Rio Pacoti. De acordo com Webber (1977), os machos podem apresentar maiores infestações que as fêmeas, diferindo dos resultados obtidos para *N. vibex*. É provável que a maior incidência de parasitas em fêmeas, principalmente afetando a gônada, esteja associada à maior disponibilidade nutritiva desse órgão.

Para o estuário do Rio Ceará, a quantificação do número de machos e fêmeas parasitados não foi realizada visto que a população de *N. vibex* presente nesse estuário apresenta a ocorrência de imposex, uma síndrome que masculiniza as fêmeas e dificulta a identificação do sexo. A análise histológica pode ser utilizada para tal fim, mas não é eficiente para determinar o sexo de animais parasitados por trematódeos digenéticos em populações afetadas pelo imposex, pois a gônada geralmente encontra-se destruída pelos esporocistos dos parasitas e a presença de pênis não pode ser usada como determinante para o sexo, impossibilitando, assim, a determinação sexual.

A diversidade da helmintofauna parasita de *Nassarius vibex* no estuário do Rio Pacoti foi menor que a registrada para o estuário do Rio Ceará. Outras espécies de gastrópodes já foram reportadas como sendo hospedeiras de espécies de trematódeos. Russel-Pinto *et al.* (2006) observaram a ocorrência de seis espécies de trematódeos digenéticos em *N. reticulatus*.

O tipo cercariano mais representativo nesse estudo foi “Echinostoma cercaria”. A presença de ventosa oral circundada por um colar de espinhos é a característica distintiva da família Echinostomatidae. Nessa família, as cercarias se desenvolvem em rédia e encistam em moluscos e outros invertebrados (SCHELL, 1970). Pelo elevado número de espécimes

parasitados, é possível que essa família de trematódeos tenha uma ligação evolutiva melhor estabelecida com *N. vibex*.

O tipo cercariano denominado “Furcocercous cercaria” brevifurca pode ser representante das famílias Schistosomatidae e Spirorchiidae, as quais não possuem hospedeiro intermediário secundário e as cercarias penetram diretamente no hospedeiro definitivo. Vários subgrupos são reconhecidos para o tipo cercariano “Microcercous cercaria”. “Cercariaeum cercaria” é um grupo não natural com representantes nas famílias Brachylaimidae, Monorchiidae, Zoogonidae e Cyclocoelidae (SCHELL *op. cit.*).

Um dos estágios larvais de trematódeo encontrado não foi classificado em nenhum dos tipos cercarianos propostos por Schell (1970). Winterbourn (1973), trabalhando com espécies de *Potamopyrgus*, encontrou esse mesmo tipo cercariano e o identificou como *Telogaster opisthorchis*, pertencente à família Heterophyidae. No presente estudo, a não realização de uma análise mais detalhada, como a microscopia eletrônica, impossibilitou a confirmação de se tratar da mesma espécie identificada por Winterbourn (*op. cit.*).

A ausência ou a drástica redução de estruturas reprodutivas primárias e secundárias em *N. vibex* foi característica dos animais parasitados por trematódeos. Os parasitas encontraram-se na gônada e principalmente espalhados pela glândula digestiva. Russel-Pinto *et al.* (2006) observaram a localização dos trematódeos na gônada e glândula digestiva de *N. reticulatus*, corroborando com os resultados obtidos para os estuários dos Rios Ceará e Pacoti.

Uma das influências da presença de trematódeos digenéticos em *Nassarius vibex* foi a inibição do desenvolvimento do pênis dos machos. Em animais muito parasitados, foi possível observar machos com papilas muito pequenas. Rato *et al.* (2009) trabalhando com parasitismo, imposex e reprodução de *N. reticulatus* também observaram uma redução no tamanho do pênis dos machos parasitados.

Foram observadas alterações histopatológicas severas devido à distribuição desses parasitas na gônada e glândula digestiva de *N. vibex*. A infestação por esses parasitas na gônada resultou na ausência de células germinativas ou sua presença em pequenas quantidades. Olabarria e Ramirez-Llodra (2004) encontraram alterações na gametogênese de *Gymnobella subaraneosa* relatando a infestação da cavidade do manto, glândula digestiva e gônada. Nessa espécie, as fêmeas apresentaram poucos ovócitos pré-vitelogênicos e nenhum ovócito vitelogênico foi observado. Os machos infectados apresentaram espermatozóides menores que os daqueles não parasitados.

Muitos estudos mostram que os parasitas podem impedir ou atrasar a gametogênese em moluscos (TETREAULT *et al.*, 2000 apud OLABARRIA; RAMIREZ-LLODRA, 2004). Rato *et al.* (2009) observaram que os parasitas têm grande influência nas espécies hospedeiras, pois estes causam castração em ambos os sexos e reduzem o tamanho do pênis dos machos, reduzindo também as chances de cópula.

Os parasitas se reproduzem tão rápido que os túbulos da glândula digestiva desaparecem e são substituídos por esporocistos ou rédias, além de cercarias em desenvolvimento (FRETTER; GRAHAM, 1962).

Os gastrópodes são, geralmente, parte do ciclo de vida de parasitas, principalmente de trematódeos digenéticos. Em alguns casos, a atividade gametogênica do caramujo é encurtada ou completamente suprimida pelo parasitismo. Em algumas espécies, o parasita ataca a gônada diretamente e esta é completamente destruída. Alguns trematódeos podem atacar a glândula digestiva e não destruir a gônada. Nesses casos, a destruição da gônada é um efeito secundário (pressão, fome, acumulação de resíduos metabólitos secundários tóxicos) do parasitismo (WEBBER, 1977).

A ocorrência de um único cisto de metacercária de Echinostomatidae no interior da estrutura digestiva (estômago) de *N. vibex* pode ter sido um evento ao acaso, visto que apenas um animal apresentou esse estágio do ciclo de vida do parasita ao longo de dezoito meses de estudo.

Larvas de cestódeos foram observadas em *N. vibex*, mas apresentaram-se pouco freqüentes nas populações de ambos os estuários. Aparentemente, os cestódeos não interferiram na reprodução dos organismos hospedeiros, ao contrário do que aconteceu com os trematódeos. Na co-infecção por trematódeos e cestódeos observou-se que o efeito deletério do parasitismo foi causado pelos trematódeos. Lauckner (1983) sugere que gastrópodes carnívoros adquirem larvas de cestódeos ao ingerir bivalves ou crustáceos infestados por cisticercoides. Este mesmo autor cita trabalhos realizados por Cake (1976 apud LAUCKNER, 1983) no qual foram obtidos cisticercoides de *Echinobothrium* sp. da glândula digestiva de *N. vibex* no Golfo do México.

A ocorrência do imposex foi uma característica exclusiva da população presente no estuário do Rio Ceará, onde a provável fonte de organoestânicos são dois estaleiros próximos à foz do estuário.

Cardoso *et al.* (2009) encontraram 100% de fêmeas com imposex na praia de Flexeiras, no Rio de Janeiro. Ao analisar os resultados do presente estudo, pode-se inferir que

a população do estuário do Rio Ceará encontra-se em uma área de contaminação moderada em relação a outras áreas.

Na população do estuário do Rio Ceará, o tamanho médio do pênis dos machos (MPL) foi 6,54 mm, enquanto o tamanho médio do pênis das fêmeas (FPL) foi 1,68 mm. Os machos apresentaram pênis com variação de tamanho de 1,5 a 10 mm e as fêmeas apresentaram pênis com variação de 0,5 a 5 mm. Na praia de Flexeiras, RJ, o MPL foi maior que o encontrado no Ceará, medindo 7,87mm. O FPL também foi mais elevado, medindo 3,07mm (CARDOSO *et al.*, 2009). Esses autores afirmam que ocorreu diferença significativa entre esses índices. As fêmeas da população da praia de Flexeiras (RJ) apresentaram comprimento do pênis maior que as do estuário do Rio Ceará, variando de 0,27 a 9,26mm, enquanto o dos machos não apresentou variação tão elevada, variando de 3,85 a 11,21mm.

O RPLI, índice que mede a relação entre o tamanho médio do pênis de machos e fêmeas com imposex, para os meses analisados no estuário do Rio Ceará foi 25,7% e variou de 0 a 51,7%. Cardoso *et al.* (2009) encontraram um RPLI de 39,01%, corroborando com os dados anteriores e sugerindo que a população do estuário do Rio Ceará encontra-se menos afetada pelos organoestênicos. Cardoso *et al.* (*op. cit.*) ainda usaram o RPSI (5,93%), mas esse índice não é adequado para as espécies de nassariídeos, pois o mesmo não apresenta resultados satisfatórios devido à morfologia peniana de *Nassarius vibex* ser bastante diferente da apresentada por *Nucella lapillus* para qual o índice foi proposto (GIBBS; BRYAN, 1994; BARROSO; MOREIRA, 1998).

Pavoni *et al.* (2007), analisando a incidência do imposex em *Nassarius nitidus* na Lagoa de Veneza, Itália, registraram índices de imposex que variaram de 88 – 100% e RPLI entre 6,1 e 46,6%. *Nassarius reticulatus* apresentou incidência de imposex de 0 até 100% e o RPLI variou entre 0 e 64% ao longo da costa de Portugal (RATO *et al.*, 2008).

A quantificação de formação do vaso deferente em fêmeas com imposex foi realizada por meio do VDSI. A média desse índice para a população de *N. vibex* foi 1,3 no estuário do Rio Ceará. O maior valor registrado de VDSI foi 1,75. Houve certa dificuldade na aplicação do VDSI em *N. vibex* visto que a formação do vaso deferente não acompanhou a do pênis, e vice versa. Queiroz *et al.* (2007) avaliaram as rotas alternativas de formação do imposex para *Stramonita haemastoma*. De acordo com esses autores, o índice original de avaliação da formação do vaso deferente não contempla a variedade de rotas encontradas para a espécie no desenvolvimento do imposex. Para *Nassarius*, o índice usado para avaliar a formação do vaso deferente é o adaptado por Stroben *et al.* (1992 apud BARREIRO *et al.*, 2001).

A ocorrência de convoluções no oviduto de algumas fêmeas nem sempre apareceu associada com a ocorrência de pênis e vaso deferente. Barreiro *et al.* (2001) registraram que as deformações no oviduto gonadal de *N. reticulatus* estavam, na sua maioria, restritas às fêmeas que apresentavam estágios avançados de imposex, sendo dependente do estágio do VDSI. Esse fato corrobora com a hipótese da presença de diferentes rotas para a expressão do imposex em *N. vibex*.

Outra alteração apresentada pelas fêmeas de *N. vibex* no estuário do Rio Ceará ocorreu na massa glandular. Essa estrutura, quando alterada, apresentava-se rígida e com coloração escura. Dentro dessas estruturas foram encontradas massas compactas de coloração marrom que ocupavam todo o espaço da massa glandular.

Alterações como estas foram relatadas para *N. reticulatus* (BARREIRO *et al.*, 2001; BARROSO *et al.*, 2002a; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007) e para *N. nitidus* (RODRÍGUEZ *et al.*, *op. cit.*), além de outras espécies não pertencentes à família Nassariidae. Esses autores relacionam essas alterações com a esterilidade das fêmeas causadas pelo acúmulo de cápsulas que não puderam ser depositadas no ambiente pelas fêmeas. Essas cápsulas recebem a denominação de cápsulas abortivas e seu acúmulo estaria relacionado com estágios avançados de VDSI.

No estuário do Rio Ceará, a alteração da massa glandular nem sempre esteve associada à presença de pênis e/ou vaso deferente. Huet *et al.* (1995 apud Barreiro *et al.*, 2001) atribuíram a esterilização de fêmeas à presença de tecido excrescente na bursa copulatória, estreitando o canal do poro genital. Esses autores descartaram a participação do vaso deferente na esterilidade, mas relataram que a ocorrência de fêmeas estéreis dá-se apenas em altas concentrações de organoestênicos.

Pelo fato dessa alteração na massa glandular ter ocorrido também em fêmeas que não apresentavam pênis e/ou vaso deferente, podem surgir dúvidas sobre a relação entre as alterações observadas e o imposex. A ausência dessas alterações em fêmeas coletadas no estuário do Rio Pacoti revelam que esse não é um fato de ocorrência natural em *N. vibex*.

Capítulo 2 - Desenvolvimento embrionário e larval de *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, Nordeste, Brasil

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do molusco consiste em uma série de estágios coordenados desde o ovo até o adulto. O ovo fertilizado, ou zigoto, sofre uma série de divisões mitóticas denominadas clivagens durante as quais se transforma em uma população de muitas células (FELL, 1997). A clivagem espiral é característica dos moluscos. Este padrão de clivagem é uma das razões da inclusão desses animais no grupo dos Espiralia do qual também fazem parte os anelídeos, vermes achatados e nemertíneos (FRETTER; GRAHAM, 1962; FIORONI, 1967; BROWDER *et al.*, 1991). A maior diferença entre o padrão de clivagem espiral e os outros padrões é a orientação oblíqua do aparato mitótico em relação ao eixo do ovo ou blastômero (BROWDER *et al.*, *op. cit.*).

A primeira clivagem é meridional, igual, e ligeiramente inclinada, produzindo dois blastômeros, denominados células AB e CD. A segunda clivagem também é meridional, produzindo quatro células de tamanhos iguais. No estágio de duas células, a célula maior é denominada célula CD. No estágio de quatro células, há uma célula grande, a célula D, e três células menores. A terceira clivagem é equatorial e altamente desigual. Durante a quarta clivagem, cada macrômero divide-se equatorialmente, originando outro macrômero no seu lado vegetal e um micrômero em seu lado animal. O rígido padrão da clivagem espiral produz uma blástula altamente ordenada, com cada célula ocupando uma posição específica (BROWDER *et al.*, 1991).

O tipo de blástula varia com o tamanho do ovo. Em espécies com pouco vitelo há uma moderada ou mesmo ampla cavidade de clivagem, mas antes do início da gastrulação, ou no seu início, os pólos animal e vegetal podem achatar e estreitar a blastocele. Em ovos com considerável quantidade de vitelo e, conseqüentemente, macrômeros grandes, a blástula resultante é mais ou menos uma esfera sólida, como em *Crepidula*, *Nassarius*, *Ocenebra*, *Urosalpinx*, *Nucella*. Uma grande quantidade de vitelo é retida no macrômero 4D, e em

Nucella e *Nassarius*, 4D tem um volume tão grande quanto, ou maior que o volume combinado dos outros macrômeros (FRETTER; GRAHAM, 1962).

A gástrula é originada de formas diferentes de acordo com o tamanho dos macrômeros (FRETTER; GRAHAM *op. cit.*). O conteúdo de vitelo determina o desenvolvimento da gastrulação onde são encontradas todas as modalidades desde a invaginação (ovos pobres em vitelo) e a epibolia (ovos ricos em vitelo) (FIORONI, 1967).

Os gastrópodes desenvolveram muitas formas diferentes de ontogênese, as quais são afetadas pela presença de diferentes reservas nutritivas embrionárias (vitelo) ou extra-embrionárias (fluido perivitelínico, ovos nutritivos) (GRACHTRUP, 1991).

Muitos animais possuem um estado imaturo de vida livre denominado larva. A larva sofre transformações, algumas vezes drásticas, para a forma adulta que envolvem nova organogênese e reorganização do plano corporal (FELL, 1997).

A maioria dos Prosobrânquios deixa os envelopes protetores em forma de trocófora, véliger ou no estado rastejante. O estágio larval típico para quase todos os moluscos, a larva véliger, pode existir como livre natante (planctônica) ou intracapsular (FIORONI *op. cit.*). A estrutura característica da larva véliger é o vélum, uma estrutura formada por tecido ciliado que apresenta as funções de natação e coleta de alimentos. A concha embrionária ou protoconcha cobre a massa visceral e apresenta uma volta e meia ou duas voltas (FRETTER, 1967).

Estudos sobre os estágios iniciais de desenvolvimento em Nassariidae foram realizados em *Nassarius pygmaeus* (CHRISTIANSEN, 1964), *Ilyanassa obsoleta* (MCCANN-COLLIER, 1984), *Nassarius reticulatus* (GRACHTRUP, 1991), *Nassarius festivus* (CHAN, 1998).

Estudos envolvendo o desenvolvimento larval das espécies do gênero *Nassarius* foram realizados para *N. incrassatus* (LEBOUR, 1931), *N. reticulatus* (LEBOUR, 1931), *N. vibex* (SCHELTEMA, 1962), *N. obsoletus* (SCHELTEMA, 1962), *N. pygmaeus* (CHRISTENSEN, 1964), *N. trivittatus* (SCHELTEMA; SCHELTEMA, 1964; PECHENIK, 1978), *N. festivus* (CHAN, 1998), *N. dentifer* (ROMERO; VALDEBENITO, 2002).

O gênero *Nassarius* foi estudado em diversos aspectos do seu desenvolvimento. Sastry (1971) e Pechenik (1978) estudaram o efeito da temperatura sobre a deposição de cápsulas em *N. obsoletus* e *N. trivittatus*, respectivamente. Ainda sobre a deposição de cápsulas, Barnett *et al.* (1980) avaliaram a seleção de substrato e a deposição das cápsulas em *N. reticulatus* e Rittschof *et al.* (2002) estudaram a mediação química na deposição de cápsulas ovíferas em *N. obsoletus*. Cheung e Lam (1999) avaliaram o efeito da

disponibilidade de alimento na produção e encapsulamento em *N. festivus*. A alimentação, assimilação e crescimento das larvas de *N. obsoletus* foram estudados por Pechenik e Fisher (1979). Génio *et al.* (2008) avaliaram o efeito da salinidade em véligers recém eclodidas de *N. reticulatus*.

D'Asaro (1993) estudou as cápsulas ovígeras de 28 espécies da família Nassariidae (subfamílias Nassariinae e Dorsaniinae). Na família Nassariidae são identificadas quatro categorias gerais de cápsulas ovígeras: (a) cápsulas buliformes com suturas e uma abertura, (b) cápsulas com cumes laterais simples (contendo suturas) e uma abertura terminal ou subterminal, (c) cápsulas com cumes laterais complexos e uma abertura terminal ou subterminal, e (d) cápsulas com cumes laterais simples e sem abertura visível (D'ASARO *op. cit.*).

Scheltema (1962) descreveu a cápsula de *Nassarius vibex* e *N. obsoletus* nos Estados Unidos e caracterizou as larvas véliгер em três estágios arbitrários da eclosão até imediatamente após a metamorfose. Os estágios adotados para a descrição das larvas foram (1) a larva no momento da eclosão, (2) a larva intermediária, e (3) a larva pedivéliger (estágio no qual a larva é capaz de nadar e rastejar com o pé desenvolvido).

Como habitantes de substratos macios, os nassariídeos se reproduzem com sucesso quando podem depositar cápsulas em objetos estáveis que se projetam acima do sedimento inconsolidado. Conseqüências da seleção em relação a esse requerimento podem ser a ocorrência frequente de ovoviviparidade ou incubação de embriões ou larvas em várias partes do corpo do parental (D'ASARO *op. cit.*).

Algumas espécies de Nassariidae encontradas no Brasil apresentam desenvolvimento ovovivíparo (*N. albus*, *N. antillarum*, *N. scissuratus*) (RIOS, 1994). A ocorrência de cápsulas ovígeras no interior do vestíbulo de fêmeas de *Nassarius vibex* foi reportada por Lima Verde (2007).

Em virtude da ampla distribuição de *Nassarius vibex* em estuários nordestinos e da sua tentativa de utilização no monitoramento em áreas estuarinas foram realizados estudos com o objetivo de elucidar a estratégia reprodutiva de *N. vibex* e verificar o tipo de desenvolvimento embrionário adotado pela espécie nas áreas estudadas. Para isso foi necessária a caracterização do desenvolvimento embrionário e larval de *Nassarius vibex*, descrevendo a desova, os estágios de desenvolvimento e as influências ambientais de áreas estuarinas sobre esse aspecto reprodutivo da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos de campo

Foram realizadas coletas mensais durante 18 meses nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti localizados na Região Metropolitana de Fortaleza. As coletas foram realizadas entre março de 2007 e agosto de 2008. Em cada área, foi coletado um número mínimo de 40 espécimes de *Nassarius vibex* que foram transportados para o Laboratório de Zoobentos do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará para análise. Os animais foram coletados manualmente durante a maré baixa, com auxílio de iscas que consistiram em pedaços de peixe fixados ao substrato por meio de palitos de madeira. Em cada coleta, foram registrados dados ambientais como temperatura do ar, salinidade e precipitação pluviométrica. A metodologia utilizada na coleta destes parâmetros está descrita com maiores detalhes no capítulo 1. As variáveis ambientais foram medidas para posteriores correlações com o período desova. Em setembro de 2008 foi realizada uma coleta adicional para concluir a análise do desenvolvimento da espécie.

2.2 Procedimentos de laboratório

Os animais coletados foram mantidos em dois aquários plásticos, um para cada estuário analisado, com 1000 ml de água trazida do local de coleta e com aeração constante durante todo o período de análise. Diariamente, a água dos aquários era trocada e verificada a presença de cápsulas nas paredes dos aquários. As cápsulas depositadas eram removidas com auxílio de pinças e agulhas finas. Todas as cápsulas foram contadas, mas apenas cápsulas intactas foram utilizadas para as medições. Os estágios de desenvolvimento dos embriões foram observados e as cápsulas fixadas em álcool 70%.

Para a análise do período de desova em ambos os estuários analisados foi registrada a quantidade de cápsulas depositadas nos aquários em todos os meses de estudo. Algumas cápsulas (N = 19) depositadas pelos animais provenientes do estuário do Rio Ceará foram mantidas em água filtrada para observações da evolução dos estágios de desenvolvimento até o momento da eclosão das larvas. Essas cápsulas foram acondicionadas

isoladamente em cubas de acrílico providas de uma tampa com malha de abertura de 300µm no seu centro. As cubas foram colocadas em um aquário 1000 ml com água do local de coleta filtrada, e aeração constante sendo observadas diariamente. O desenvolvimento foi observado por transparência com auxílio de um microscópio estereoscópico de luz transmitida e um microscópio óptico. As cápsulas e os embriões foram observados e fotografados em microscópio binocular com óptica infinita, modelo TNB-04T-PL, marca OPTON, com câmera digital acoplada (modelo DCE-2).

A caracterização dos estágios de desenvolvimento embrionário e larval foi realizada com organismos obtidos de cápsulas incubadas retiradas das fêmeas e das cápsulas depositadas nos aquários. Os estágios de desenvolvimento embrionário foram classificados com base no trabalho de Chan (1998) com *Nassarius festivus*.

As medidas das cápsulas ovíferas de *Nassarius vibex* consistiram na altura e largura da cápsula. As cápsulas foram medidas da sua base até a porção mais alta da zona de escape após fixadas. Os embriões foram medidos em cápsulas frescas, antes da fixação. A quantificação dos embriões foi feita por contagem direta através da parede transparente da cápsula. Para a medição das cápsulas e dos embriões foi utilizado microscópio binocular acoplado ao computador e utilizando o programa ScopePhoto © versão 1.0.

O estudo da incubação de cápsulas na espécie foi realizado pela análise dos animais adultos. Para essa análise foram utilizados animais vivos provenientes dos dois estuários estudados (Ceará e Pacoti) como descrito no capítulo 1. Esse procedimento consistiu na observação da parte mole de fêmeas da espécie para registrar a ocorrência de cápsulas no interior do vestíbulo e analisar o estágio de desenvolvimento dos embriões ou larvas presentes nessas cápsulas. Para a análise das cápsulas incubadas o termo embrião refere-se indistintamente aos estágios de desenvolvimento desde a primeira clivagem até o estágio de gástrula.

Para analisar a relação entre a temperatura, salinidade e pluviosidade com a presença de cápsulas, tanto depositadas nos aquários como incubadas pelas fêmeas, nas populações estudadas foi utilizado o coeficiente de correlação para postos de Spearman do software STATISTICA for Windows versão 7.0.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da desova e estágios do desenvolvimento

As cápsulas de *Nassarius vibex* são depositadas individualmente, às vezes em pequenos grupos de até cinco cápsulas, mas nunca em contato direto umas com as outras (Figura 27). As cápsulas são arredondadas, comprimidas bilateralmente e de forma lenticular, são transparentes e apresentam estrias na superfície externa. São fixadas pelas fêmeas nas paredes dos aquários por um curto pedúnculo de fixação (Figura 28). Apresentam uma abertura de escape na porção apical (Figura 28), pela qual ocorre a liberação das larvas no estágio de véliger.

Os embriões e larvas puderam ser vistos por transparência através da parede das cápsulas, não sendo necessária sua remoção para a visualização dos organismos ao microscópio estereoscópico de luz transmitida e ao microscópio óptico.

Durante as observações em laboratório, foram depositadas nos aquários 493 cápsulas ao longo dos meses de março de 2007 a agosto de 2008 pelas fêmeas provenientes do estuário do Rio Ceará. Destas cápsulas, 334 foram analisadas. As demais (159) não foram utilizadas por estarem vazias ou apresentarem algum tipo de deterioração resultante do manuseio para sua remoção dos aquários. As fêmeas do estuário do Rio Pacoti depositaram 39 cápsulas das quais 36 foram medidas. Todas as cápsulas medidas provenientes de fêmeas do estuário do Rio Pacoti foram depositadas em julho de 2007.

As cápsulas depositadas por fêmeas do estuário do Rio Ceará apresentaram altura média de 1293 μ m (N = 334; DP = 0,14) e largura média 1142 μ m (N = 334; DP = 0,12). As cápsulas depositadas por fêmeas do estuário do Rio Pacoti apresentaram altura média 930 μ m (N = 36; DP = 0,13) e largura média 914 μ m (N = 36; DP = 0,14).

No interior das cápsulas, foram observados embriões em diferentes estágios de clivagem e de desenvolvimento larval. Algumas apresentavam larva véliger avançada que já haviam sofrido a primeira torção na protoconcha. O número médio de embriões por cápsula depositada pelas fêmeas do estuário do Rio Ceará foi 29,4 embriões (N = 29; DP = 10,8). Não foi feita a quantificação para as cápsulas depositadas pelas fêmeas do estuário do Rio Pacoti.

Os estágios de desenvolvimento observados nas cápsulas depositadas nos aquários e naquelas removidas do vestíbulo de fêmeas foram classificados como ovo, embrião

(primeira clivagem, blástula, gástrula inicial, gástrula avançada), pré-véliger, véliger inicial, e véliger (estágio mais avançado das larvas próximo à sua liberação da cápsula).

Os embriões são massas celulares esféricas com pouca diferenciação entre as células. O estágio de pré-véliger caracteriza-se pelo alongamento do organismo e diferenciação da região cefálica, apresentam protoconcha fina e transparente e grande quantidade de vitelo. Os organismos em estágio de véliger inicial apresentam vélu pouco desenvolvido com cílios velares muito pequenos, mas com capacidade de movimentação, grânulos de vitelo na massa cefálica, estatocisto e opérculo. Os organismos em estágio de véliger (avançada) apresentam vélu bilobulado mais desenvolvido, arredondado, cílios velares maiores e com movimentação, protoconcha globosa, estatocistos, pé e opérculo.

Foram realizadas medições em 165 embriões das cápsulas depositadas nos aquários pelas fêmeas do estuário do Rio Ceará. Os estágios de desenvolvimento mais representativos foram os de gástrula inicial e gástrula em 29,70% e 28,48% das cápsulas, respectivamente.

Os estágios mais iniciais observados do desenvolvimento embrionário foram os estágios de ovo e a primeira clivagem a qual resulta em duas células (Fig. 29 A,B). Em seguida foi verificado o estágio de blástula, com a separação do macrômero no pólo vegetal e micrômero no pólo animal (Fig. 29C; Tab. 4), nesse estágio os embriões apresentam altura média de 131 μ m e largura média de 117 μ m. O estágio de gástrula inicial (Fig. 29D; Tab. 4) caracteriza-se pela forma arredondada, com os micrômeros recobrando os macrômeros. A altura média dos embriões nesse estágio é 114 μ m e a largura média é de 110 μ m. O estágio de gástrula (Fig. 29E; Tab. 4) apresenta um ligeiro alongamento do plano corporal e possui movimentos rotatórios. A altura média para esse estágio é de 130 μ m e largura de 123 μ m. A larva véliger (Fig. 29F; Tab. 4) forma-se posteriormente, apresentando uma fina concha embrionária transparente, vélu com cílios, opérculo, olhos e estatocistos. As medidas da concha da véliger são a altura média de 104 μ m e a largura média de 158 μ m.

Observações em laboratório mostraram que as larvas eclodem no estágio de véliger, com vélu bilobulado. Não há ovos nutritivos.

O tempo entre a deposição das cápsulas pelas fêmeas de *N. vibex* e a liberação das larvas no estágio de véliger é bastante variável, podendo demorar de 1-2 dias até 10 dias. Esse dado foi obtido por meio de uma estimativa analisando a duração dos estágios até sua transformação para o estágio seguinte.

Tabela 4 – Medidas dos estágios embrionários e larval de *Nassarius vibex* provenientes do estuário do Rio Ceará.

<i>Estágio</i>	<i>Nº de observações</i>	<i>Altura média</i> (μm)	<i>Largura</i> <i>média</i> (μm)	<i>%</i>
Ovo	20	108 (dp = 0,0079)	106 (dp = 0,0078)	12,12
Primeira clivagem	7	172 (dp = 0,0065)	125 (dp = 0,0100)	4,24
Blástula	31	131 (dp = 0,0116)	117 (dp = 0,01079)	18,79
Gástrula inicial	49	114 (dp = 0,0152)	110 (dp = 0,0117)	29,70
Gástrula	47	130 (dp = 0,0095)	123 (dp = 0,0149)	28,48
Véliger*	11	104 (dp = 0,0210)	158 (dp = 0,0239)	6,70

* medidas da concha larval



Figura 27 – Disposição das cápsulas de *Nassarius vibex* depositadas na parede do aquário. Imagem do aquário vazio. A seta indica uma das cinco cápsulas depositadas.

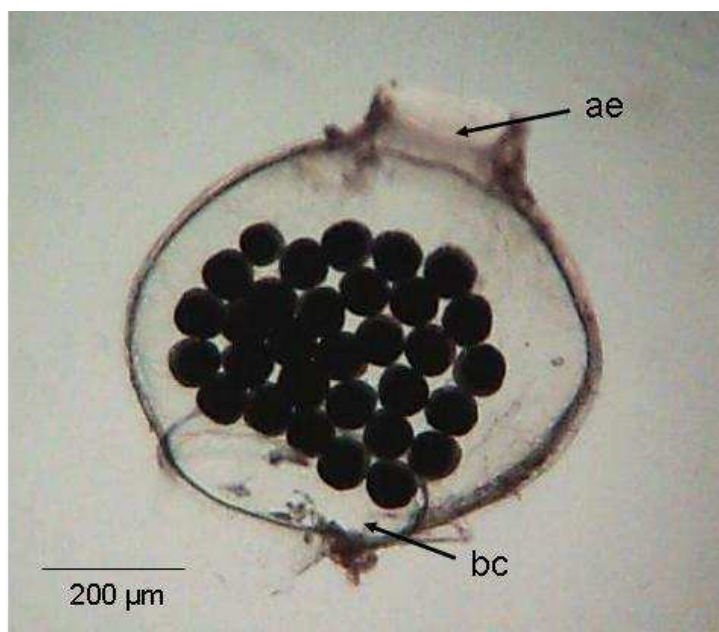


Figura 28 – Fotografia ao microscópio óptico de uma cápsula de *Nassarius vibex* depositada em laboratório. Aumento 40x. Legenda: ae – abertura de escape; bc – base da cápsula.



Figura 29 – Estágios de desenvolvimento embrionário e larval de *Nassarius vibex*. A. Estágio de ovo; B. Primeira clivagem; C. Estágio de blástula; D. Estágio de gástrula inicial; E. Estágio de gástrula; F. Estágio larval de pré-véliger. G. Estágio de véliger embrionária. H. Véliger recém eclodida. Legenda: c – cílios do véllum; cl – concha larval; es – estatocisto; ma – macrômero; mi – micrômero; op – opérculo; p – pé; v – véllum.

3.2 Análise do período de desova

As fêmeas coletadas no estuário do Rio Ceará depositaram cápsulas ovíferas nos aquários durante os meses de julho a dezembro de 2007 e de junho a setembro de 2008 (Figura 30). A postura de fêmeas provenientes do estuário do Rio Pacoti ocorreu somente nos meses de junho, julho e outubro de 2007.

A população de *Nassarius vibex* no estuário do Rio Ceará apresentou um período de desova de junho a dezembro, com um pico em julho. Este comportamento de liberação de cápsulas repetiu-se nos anos de 2007 e 2008. Não foi possível definir o período de deposição das cápsulas para a população do estuário do Rio Pacoti visto que a ocorrência de desovas em laboratório foi muito escassa.

Foi observado que o período de deposição de cápsulas por *Nassarius vibex* no estuário do Rio Ceará está inversamente relacionado ao período chuvoso da região ($r_s = -0,629486$; $p < 0,05$) (Figura 30). Os outros fatores abióticos trabalhados não apresentaram correlação significativa com a deposição de cápsulas. Não foram observadas correlações entre as variáveis abióticas no estuário do Rio Pacoti e a deposição de cápsulas em laboratório.

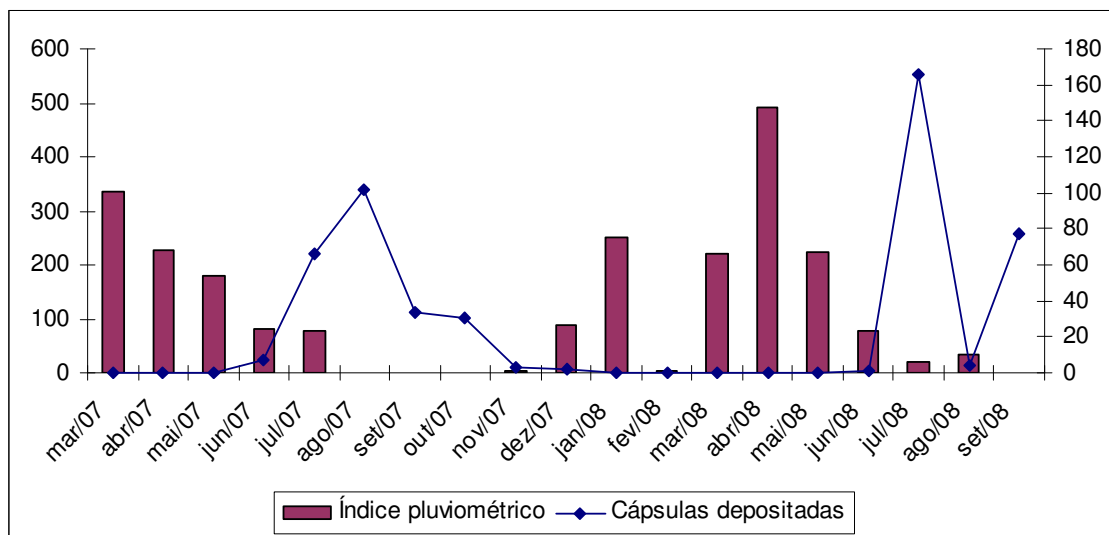


Figura 30 – Correlação entre o índice pluviométrico registrado para o estuário do Rio Ceará e o número de cápsulas depositadas por *Nassarius vibex* em laboratório.

3.3 Análise das cápsulas incubadas

A observação das estruturas reprodutivas secundárias de fêmeas de *Nassarius vibex* provenientes dos estuários dos Rios Ceará e Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008 mostrou a presença de cápsulas no interior do vestíbulo. As cápsulas puderam ser visualizadas por transparência e foi observada a ocorrência de embriões e larvas em diferentes estágios.

No estuário do Rio Ceará, durante os meses de março de 2007 a agosto de 2008, foram analisadas 370 fêmeas das quais 203 (54,86%) estavam incubando cápsulas ovíferas. Nesse mesmo período, no estuário do Rio Pacoti, das 461 fêmeas analisadas foram encontradas 115 fêmeas (25%) portando cápsulas ovíferas no interior do vestíbulo.

O número de cápsulas encontradas em fêmeas de *N. vibex* coletadas no estuário do Rio Ceará apresentou distribuição mais homogênea ao longo do período de estudo do que os animais analisados no estuário do Rio Pacoti (Figura 31).

Para a população de *N. vibex* do estuário do Rio Ceará foi verificada uma correlação negativa significativa entre o período chuvoso e a presença de cápsulas incubadas pelas fêmeas ($r_s = -0,689349$; $p < 0,05$) com o maior número de cápsulas durante o período mais seco do ano (Figura 32). No estuário do Rio Pacoti essa relação não foi observada ($r_s = -0,199282$; $p < 0,05$), com a distribuição bastante irregular do número de fêmeas incubando cápsulas em relação ao índice pluviométrico para o período (Figura 33). A salinidade apresentou correlação significativa com a ocorrência de cápsulas incubadas ($r_s = 0,540135$; $p < 0,05$) apenas no estuário do Rio Ceará. Não houve correlação significativa entre a temperatura e a presença de cápsulas incubadas para os dois estuários analisados.

Foi verificada uma correlação positiva entre as cápsulas incubadas e as cápsulas depositadas para o estuário do Rio Ceará ($r_s = 0,591364$; $p < 0,05$). Essa correlação não foi demonstrada para o estuário do Rio Pacoti ($r_s = 0,081904$; $p < 0,05$).

No estuário do Rio Ceará, foram encontradas 84 cápsulas contendo embriões (termo geral para todos os estágios) e 66 contendo larvas véliger. No estuário do rio Pacoti foram registradas 36 cápsulas contendo embriões e 49 contendo véliger.

As cápsulas encontradas no interior dessas fêmeas não apresentavam a forma lenticular, característica das cápsulas depositadas, sendo esféricas e mais maleáveis. A abertura de escape e o curto pedúnculo de fixação também foram observados em cápsulas incubadas.

A ocorrência de fatores que afetam a reprodução de *Nassarius vibex* nos estuários analisados foi abordada no capítulo 1. A ocorrência de parasitismo nas duas populações estudadas e de imposex na população do estuário do Rio Ceará foi analisada e correlacionada com a incubação de cápsulas. Foi observado que as fêmeas que estavam parasitadas por trematódeos digenéticos não estavam produzindo cápsulas ovíferas em ambos os estuários. Para o estuário do Rio Pacoti, a correlação de Spearman entre fêmeas parasitadas e a incubação de cápsulas foi significativa, confirmando as observações da morfologia ($r_s = -0,671595$; $p < 0,05$).

Não foi realizada a correlação entre fêmeas parasitadas e a incubação de cápsulas para a população do estuário do Rio Ceará, pois alguns animais parasitados não puderam ter seu sexo determinado visto que essa população apresenta-se afetada pelo imposex que não permite que a determinação sexual seja realizada apenas pela presença de pênis. Como já mencionado no capítulo 1, alguns animais parasitados não apresentam as estruturas sexuais secundárias necessárias a uma identificação acurada do sexo em populações afetadas pelo imposex. A análise histológica também não foi conclusiva.

Para o estuário do Rio Ceará, a análise de correlação de Spearman não foi significativa para as variáveis fêmeas com imposex e fêmeas incubando cápsulas ($r_s = 0,059098$; $p < 0,05$).

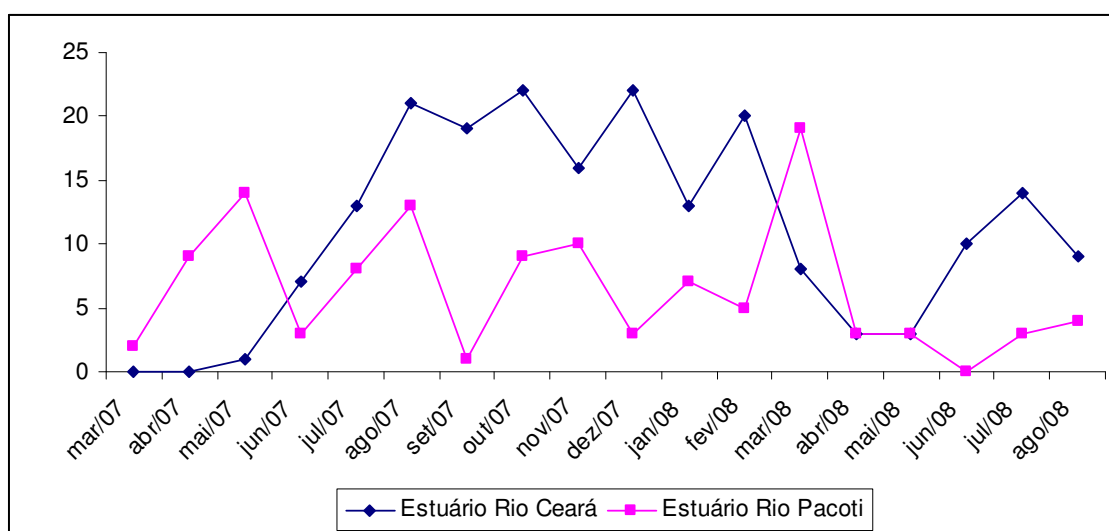


Figura 31 – Número de cápsulas encontradas no interior do vestíbulo das fêmeas de *Nassarius vibex* nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti de março de 2007 a agosto de 2008.

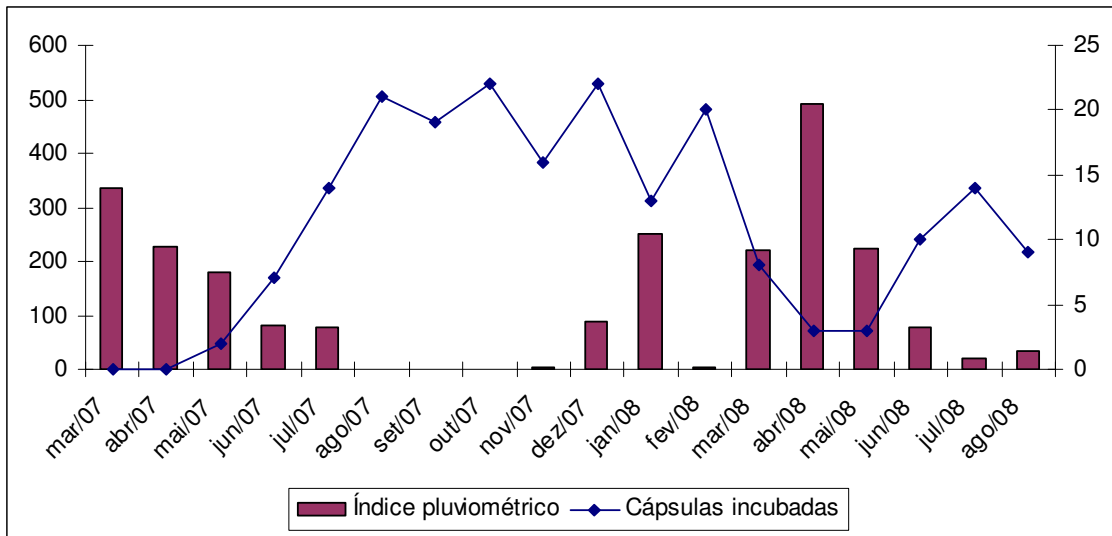


Figura 32 – Número de cápsulas encontradas no interior do vestíbulo das fêmeas de *Nassarius vibex* no estuário do Rio Ceará em relação ao índice pluviométrico entre março de 2007 a agosto de 2008.

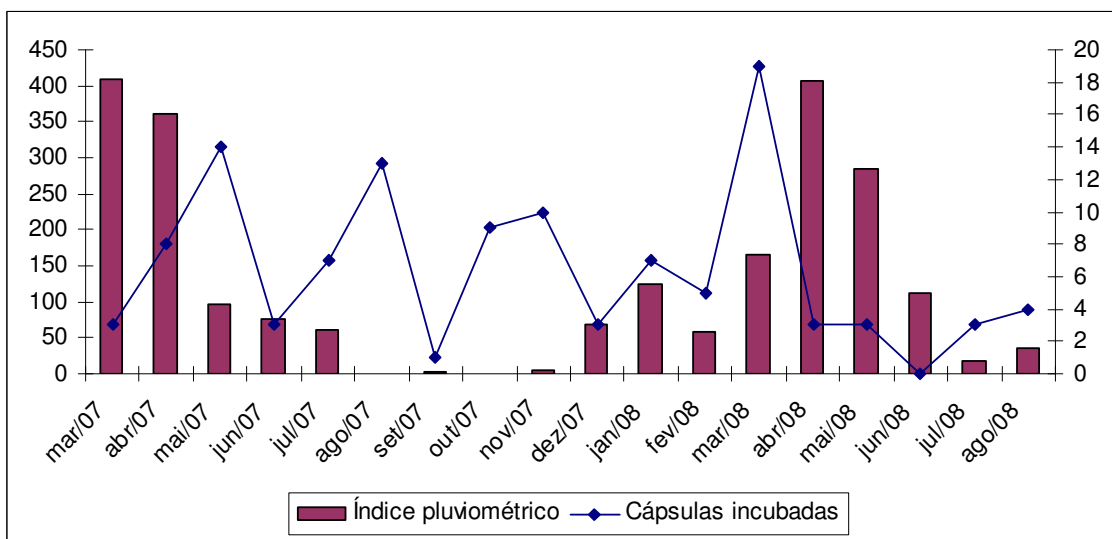


Figura 33 – Número de cápsulas encontradas no interior do vestíbulo das fêmeas de *Nassarius vibex* no estuário do Rio Pacoti em relação ao índice pluviométrico entre março de 2007 a agosto de 2008.

4. DISCUSSÃO

A forma básica das cápsulas da subfamília Nassariinae é um envelope simples, geralmente lenticular com um local de escape específico (D'ASARO, 1993). As cápsulas de *Nassarius vibex* depositadas pelas fêmeas dos estuários dos Rios Ceará e Pacoti seguem esse padrão. São arredondadas, de forma lenticular, transparentes, apresentam estrias na superfície externa e possuem um curto pedúnculo de fixação pelo qual ficam aderidas ao substrato. Apresentam uma abertura de escape na porção apical pela qual ocorre a liberação das larvas no estágio de véliger. De acordo com D'Asaro (*op. cit.*), podem ser classificadas na categoria das cápsulas com cumes laterais simples e uma abertura terminal ou subterminal.

A primeira descrição das cápsulas de *N. vibex* foi realizada por Scheltema (1962) em Massachussets, Estados Unidos. De acordo com suas observações, as cápsulas foram descritas como sendo lisas, em forma de urna, pedunculadas, esbranquiçadas translúcidas.

As cápsulas de *N. vibex* descritas por Scheltema (1962) e as observadas no presente trabalho diferem em relação ao comprimento do pedúnculo de fixação. Outros autores também estudaram as cápsulas da espécie em regiões geográficas diferentes e observaram discrepâncias na descrição das cápsulas, em especial em relação ao pedúnculo de fixação. Não há um consenso sobre a causa dessas diferenças que podem ser desde adaptações ao ambiente no qual os organismos estão inseridos até a possibilidade da existência de duas espécies ao invés de uma. Maiores detalhes sobre essa discussão foram descritos por D'Asaro (1993) o qual relata trabalhos de diversos autores.

As cápsulas depositadas por fêmeas de *N. vibex* do estuário do Rio Ceará apresentaram altura média de 1293 μ m (1,3 mm) e largura média 1142 μ m (1,1 mm). As cápsulas depositadas por fêmeas do estuário do Rio Pacoti apresentaram altura média 930 μ m (0,9 mm) e largura média 914 μ m (0,9 mm). Scheltema (1962) observou cápsulas de *N. vibex* com altura de 1,6 mm. Em *Nassarius festivus*, o comprimento das cápsulas foi 1,88 mm e largura de 1,42 mm (CHAN, 1998), enquanto para *N. trivittatus* (PECHENICK, 1978) registrou-se altura de 2,0 mm e largura de 1,3 mm.

O número médio de embriões por cápsula depositada pelas fêmeas do estuário do Rio Ceará foi 29,4 embriões (N = 29; DP = 10,8). Não foi feita a quantificação para as cápsulas depositadas pelas fêmeas do estuário do Rio Pacoti. No estudo realizado por Scheltema (1962), *N. vibex* apresentou de 12-30 ovos por cápsula, geralmente em torno de 20

ovos. *Nassarius festivus* (CHAN, 1998) apresenta em média 30,76 ovos/cápsula, enquanto *N. trivittatus* (PECHENICK, 1978) apresenta em média 109,5 ovos/cápsula.

Baseado na observação de três espécimes de *N. albus*, Cather (1973b) sugeriu a ocorrência de ovos nutritivos ao encontrar duas classes de tamanho de ovos na espécie. Uma delas serviria como ovos nutritivos, enquanto a outra completaria o desenvolvimento embrionário. Em *Nassarius vibex*, não foram encontrados ovos nutritivos em nenhuma das populações analisadas.

Nos estuários analisados, *Nassarius vibex* libera suas larvas no estágio de véliger, assim como observado por Scheltema (1962).

As larvas véliger de *N. vibex*, no momento da eclosão, apresentam comprimento de 250µm (maior distância entre o ápice da espira até a base da abertura), pé geralmente assimétrico usualmente deslocado para a esquerda, e com projeções conspícuas na porção distal; vélum sem pigmentação na borda (SCHELTEMA, 1962). A larva véliger da população do estuário do Rio Ceará apresenta uma fina concha embrionária transparente, vélum com cílios, opérculo, olhos e estatocistos. A concha da véliger apresentou altura média de 104µm e a largura média de 158µm, portanto menor que a reportada por Scheltema (1962).

O tempo entre a deposição das cápsulas pelas fêmeas de *N. vibex* e a liberação das larvas no estágio de véliger é bastante variável podendo demorar de 1-2 dias até 10 dias. Esse dado foi obtido por meio de uma análise da duração dos estágios até sua transformação para o estágio seguinte. Essa diferença no tempo de eclosão ocorre porque as cápsulas de *Nassarius vibex* são depositadas em estágios diferentes, ou seja, não há sincronismo entre os estágios de desenvolvimento no momento da deposição, podendo ser desde a primeira clivagem (estágio de duas células) até larvas véligers com a primeira volta da protoconcha.

Cernohorsky (1984 apud CHAN; MORTON, 2005) registrou que, nas espécies tropicais de Nassariidae, as fêmeas desovam durante todo o ano e demora apenas de 4-6 dias da deposição das cápsulas até a eclosão enquanto as espécies de águas temperadas levam de 3-4 semanas para a eclosão das larvas.

Em *N. trivittatus* (PECHENICK, 1978), o tempo de eclosão das larvas no estágio de véliger no plâncton é determinado pela temperatura. Em temperaturas de 11,2°C, as larvas demoram de 27-28 dias para eclodir enquanto em temperaturas mais altas (21°C) o tempo de eclosão sofre drástica redução de 5-7 dias. O período de desenvolvimento de *N. festivus* no interior da cápsula até a eclosão como larva véliger planctotrófica varia entre 9 e 12 dias, com temperatura variando entre 22 e 25°C (Chan e Morton, 2005). A variação no tempo de eclosão das larvas véliger em *N. vibex* provenientes do estuário do Rio Ceará (1-2 dias até 10 dias)

mostrou maior variação do que *N. festivus* em virtude da ocorrência de incubação das cápsulas. Por ser uma espécie tropical, *N. vibex* tem um curto período entre a deposição das cápsulas até a eclosão (tempo máximo estimado de 10 dias).

O período de desova nas populações estudadas foi bem marcado para o estuário do Rio Ceará. O mesmo não foi percebido para o estuário do Rio Pacoti. As fêmeas coletadas no estuário do Rio Ceará depositaram cápsulas ovíferas nos aquários durante os meses de julho a dezembro de 2007 e de junho a setembro de 2008. A postura de fêmeas provenientes do estuário do Rio Pacoti ocorreu somente nos meses de junho, julho e outubro de 2007.

Foi observado que o período de deposição de cápsulas por *N. vibex* no estuário do Rio Ceará está inversamente relacionado ao período chuvoso da região. Os outros fatores abióticos trabalhados como a salinidade e a temperatura não apresentaram correlação significativa com a deposição de cápsulas. Não foram observadas correlações entre as variáveis abióticas no estuário do Rio Pacoti e a deposição de cápsulas em laboratório provavelmente devido a escassez de eventos de desova para a população.

Ao contrário do que é registrado para espécies de nassariídeos de clima temperado, como *N. obsoletus* (SASTRY, 1971) e *N. trivittatus* (PECHENICK, 1978), a temperatura não é um fator limitante para *N. vibex* no nordeste do Brasil. Com clima tropical e pouca variação anual de temperatura, esse fator tem pouca ou nenhuma influência nos eventos reprodutivos da espécie.

A ocorrência de posturas em laboratório, imediatamente após a coleta, reflete a condição reprodutiva das fêmeas na população proveniente do estuário do Rio Ceará. Apesar dessa população ser afetada pela ocorrência de imposex e parasitismo, a manutenção dos estoques de larvas parece estar assegurada.

Embora tenha ocorrido parasitismo em ambas as populações estudadas, o estuário do Rio Pacoti apresentou maior prevalência desses parasitas. Das 461 fêmeas coletadas no estuário do Rio Pacoti, 56% estavam parasitadas.

A redução ou a parada na produção de ovos pode ser uma consequência direta da patologia induzida pelo parasita. Em muitos invertebrados, a produção de ovos está relacionada ao estado nutricional. Assim, se uma infecção parasitária afeta a aquisição de alimento ou o parasita compete diretamente pelos nutrientes do hospedeiro, a fecundidade pode declinar como uma consequência direta (HURD, 2001).

Potamopyrgus antipodarum, gastropoda ovovivíparo da família Hydrobiidae, infectados por trematódeos não carregavam ovos (GÉRARD *et al.*, 2003). No isópoda *Cyathura carinata*, foram observados cistos de metacercaria no abdômen de alguns

exemplares. Foi observado que fêmeas parasitadas não portavam ovos ou bolsas de incubação enquanto as fêmeas que não apresentavam cistos de metacercaria apresentavam-se ovígeras (JENSEN *et al.*, 2004).

A estratégia reprodutiva de mais de 80% da subfamília Nassariinae permanece desconhecida, mas a ocorrência freqüente de ovoviviparidade (onze espécies) sugere que outros representantes dessa subfamília podem apresentar essa estratégia. Os métodos de incubação de embriões reportados para as espécies de Nassariinae incluem embriões mantidos no oviduto apresentando algum tipo de encapsulação e embriões mantidos no oviduto ou na cavidade do manto sem a presença de cápsula. O estágio de liberação em Nassariinae ovovivíparos pode ser na forma de véliger ou juvenis (D'ASARO, 1993).

A observação das estruturas reprodutivas secundárias de fêmeas de *Nassarius vibex* provenientes dos estuários dos Rios Ceará e Pacoti mostrou a ocorrência de cápsulas no interior do vestíbulo, podendo ser observada a ocorrência de embriões e larvas em diferentes estágios. A ocorrência de cápsulas contendo larvas véligers sugere uma tentativa de proteção desses estágios mais vulneráveis.

Bullia melanoides apresenta uma forma peculiar de proteção das cápsulas ovígeras. As cápsulas ficam protegidas no pé das fêmeas, o qual forma uma espécie de bolsa protetora. Os jovens eclodem das cápsulas como miniatura dos adultos (ANSELL; TREVALLION, 1970; D'ASARO, 1993).

Kaicher (1972) e Cather (1973 a,b) observaram a ocorrência de ovoviviparidade em *Nassarius albus*. Kaicher (*op. cit.*) observou conchas embrionárias e embriões encontrados no oviduto de fêmeas.

Cather (1973a) analisou fêmeas portando juvenis no órgão denominado útero, que provavelmente apresenta a mesma função do vestíbulo de *N. vibex*, mas não observou ovos, estágios de clivagem nem embriões iniciais. Não foram encontradas membranas circundando os embriões nem cápsulas ovígeras. Ainda segundo Cather (*op. cit.*), a seleção da ovoviviparidade em *Nassarius* parece estar relacionada a mudanças de salinidade presentes no ambiente em que vivem esses animais.

A salinidade dos estuários apresentou correlação significativa positiva com a incubação de cápsulas apenas no estuário do Rio Ceará. Esse dado indica que o mecanismo de incubação não deve ser uma resposta à condição de redução da salinidade que ocorre em áreas estuarinas e pode tornar-se adversa para animais de origem marinha. A correlação positiva entre a ocorrência de cápsulas incubadas e a deposição de cápsulas nos aquários sugere que esses eventos ocorrem concomitantemente.

Encontrar um substrato favorável para a deposição de cápsulas pode ser um problema, podendo-se especular que deve ocorrer uma pressão seletiva favorecendo a deposição de cápsulas sobre conchas de animais da mesma espécie, incubação sobre ou dentro do corpo do parental, ou ovoviviparidade. Conseqüentemente, não é surpreendente a ocorrência freqüente dessas estratégias em ambas as subfamílias de Nassariidae (D'ASARO, 1993). Dessa forma, pode-se sugerir que as fêmeas de *Nassarius vibex* nos estuários analisados podem usar a estratégia de reter suas cápsulas no vestíbulo por um período maior a fim de encontrar um substrato favorável e até mesmo protegê-las de possíveis predadores.

Em *Nassarius kraussianus*, foi observada encapsulação de algum tipo retida no oviduto e estágio de liberação como larva véliger (KILBURN; RIPPEY, 1982 apud D'ASARO, 1993). Chan e Morton (2005) observaram a ocorrência de cápsulas no interior da glândula da cápsula em fêmeas de *Nassarius festivus*. Diferentemente desses autores as cápsulas de *N. vibex* encontravam-se no vestíbulo.

A análise das cápsulas incubadas, quando relacionada com o grau de parasitismo da população estudada, pode indicar o grau de sanidade da mesma. Foi observado que as fêmeas que estavam parasitadas por trematódeos digenéticos não estavam produzindo cápsulas ovíferas em ambos os estuários. Para o estuário do Rio Pacoti, a correlação negativa entre fêmeas parasitadas e a incubação de cápsulas confirmou as observações da morfologia.

Considerações Finais

As populações de *Nassarius vibex* presentes nos estuários dos Rios Ceará e Pacoti, apesar de estarem geograficamente próximas, apresentam características distintas que impedem a determinação de parâmetros ecológicos para a espécie. A reprodução em cada uma das populações analisadas, apresenta interferências peculiares que as tornam únicas.

As interações com outras espécies, com as variáveis ambientais e com poluentes introduzidos pelo homem no ambiente influenciam diretamente a reprodução das espécies de moluscos, o que pôde ser comprovado analisando as populações encontradas nos estuários estudados.

O parasitismo apresentou influência em todos os aspectos da biologia reprodutiva da espécie, reduzindo o número de animais capazes de reproduzir devido às alterações nas gônadas, destruição das estruturas responsáveis pela formação de cápsulas ovíferas e pela redução do órgão copulatório masculino, interferindo no processo de cópula. O imposex, por sua vez, pode causar problemas na reprodução pela esterilização de fêmeas.

O presente trabalho sugere a ocorrência de rotas alternativas de imposex em *Nassarius vibex* visto que foram encontradas fêmeas sem pênis ou vaso deferente, mas com início de convolução do oviduto, além de fêmeas com alterações na massa glandular que indicam esterilidade. Esses dados revelam a necessidade de estudos controlados de exposição de *N. vibex* à concentrações pré-determinadas e crescentes de organoestânicos, usando populações de áreas livres de contaminação e que não apresentem parasitismo.

A população presente no estuário do Rio Ceará, apesar de estar afetada pelo imposex, uma síndrome que altera a reprodução em algumas populações de gastrópodes, apresentou um período reprodutivo definido no qual ocorreu a deposição de cápsulas ovíferas em laboratório. Isso indica que o imposex não está afetando a população e que há o suprimento de larvas para repor os estoques.

Na população do estuário do Rio Pacoti, não foi observado o fenômeno imposex, mas o parasitismo elevado influenciou na atividade reprodutiva e limitou a deposição de cápsulas pelas fêmeas em laboratório, além de tornar irregular a presença de cápsulas incubadas pelas fêmeas. Apesar de ser um assunto menos abordado com relação à reprodução dos gastrópodes, principalmente no Brasil, o parasitismo mostrou ter maior impacto sobre a população do que o imposex que é mais amplamente estudado no país.

Em relação à reprodução de *Nassarius vibex*, ainda é necessário realizar análises complementares do ciclo reprodutivo e da dinâmica das populações nos dois estuários. Essas análises poderão consolidar ainda mais as informações apresentadas nesse trabalho e tentar estabelecer os padrões que determinam a estrutura das populações.

REFERÊNCIAS

ANSELL, A.D.; TREVALLION, A. Brood protection in the stenoglossan gastropod *Bullia melanoides* (Deshayes). **Journal of Natural History**. v. 4, p. 369-374, 1970.

BARNETT, P.R.O.; HARDY, B.L.S.; WATSON, J. Substratum selection and egg-capsule deposition in *Nassarius reticulatus* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 45, p. 95-103, 1980.

BARREIRO, R.; GONZÁLES, R.; QUINTELA, M.; RUIZ, J.M. Imposex, organotin bioaccumulation and sterility of female *Nassarius reticulatus* in polluted areas of NW Spain. **Marine Ecology Progress Series**. v. 218, p. 203-212, 2001.

BARROSO, C.M.; MOREIRA, M.H. Reproductive cycle of *Nassarius reticulatus* in the Ria de Aveiro, Portugal: implications for imposex studies. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 78, p. 1233-1246, 1998.

BARROSO, C.M.; MOREIRA, M.H.; BEBIANNO, M.J. Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. **Marine Ecology Progress Series**. v. 230, p. 127-135, 2002a.

BARROSO, C.M.; MOREIRA, M.H.; RICHARDSON, C.A. Age and growth of *Nassarius reticulatus* in Ria de Aveiro, north-west Portugal. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 85, p. 151-156, 2005a.

BARROSO, C.M.; REIS-HENRIQUES, M.A.; FERREIRA, M.S.; MOREIRA, M.H. The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 82, p. 249-255, 2002b.

BARROSO, C.M.; REIS-HENRIQUES, M.A.; FERREIRA, M.; GIBBS, P.E.; MOREIRA, M.H. Organotin contamination, imposex and androgen/oestrogen ratios in natural populations of *Nassarius reticulatus* along a ship density gradient. **Applied Organometallic Chemistry**. v. 19, p. 1141-1148, 2005b.

BROWDER, L. M.; ERICKSON, C. A.; JEFFERY, W. R. **Developmental Biology**. 3. ed. Florida: Sounders College Publishing, 1991. 754p.

CARDOSO, R.S.; CAETANO, C.H.S.; CABRINI, T.M.B. Biphallia in imposed females of marine gastropods: new record for *Nassarius vibex* from Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 69, n. 1, p. 223-224, 2009.

CATHER, J.N. Ovoviviparity in *Nassarius albus* (Gastropoda, Prosobranchia). **Journal de Conchyliologie**. v.110, p. 83-86, 1973a.

CATHER, J.N. Further observations on ovoviviparity in *Nassarius albus*. **Journal de Conchyliologie**. v.110, p. 88, 1973b.

CHAN, K. The development of *Nassarius festivus* (Powys, 1835) (Gastropoda: Nassariidae) in Hong Kong. **The Marine Biology of the South China Sea**. p. 321-330, 1998.

CHAN, K. A review of studies on the Nassariidae (Mollusca: Gastropoda). IN: **Tuning tides: a festschrift in honor of professor Brian Morton**. Ed. P.K.S. Shin, p. 77-92, 2003.

CHAN, K.; MORTON, B. The effects of organotin pollution on *Nassarius festivus* (Powys, 1835) (Gastropoda: Nassariidae) in Hong Kong. In: **Perspectives on Marine Environment Change in Hong Kong and Southern China, 1977-2001** (ed. B. Morton). Proceedings of an International Workshop Reunion Conference, Hong Kong: Hong Kong University Press p. 555-578, 2003.

CHAN, K.; MORTON, B. The reproductive biology of *Nassarius festivus* (Powys, 1835) (Gastropoda: Nassariidae) in relation to seasonal changes in temperature and salinity in subtropical Hong Kong. **Aquatic Ecology**. v. 30, p. 213-228, 2005.

CHEUNG, S.G.; LAM, S. Effect of food availability on egg production and packaging in the intertidal scavenging gastropod *Nassarius festivus*. **Marine Biology**. v. 135, p. 281-287, 1999.

CHRISTIANSEN, M.E. Some observations on the larval stages of the gastropod *Nassarius pygmaeus* (Lamarck). **Publicazioni della Stazioni Zoologica di Napoli**. v. 34, p. 1-8, 1964.

COELHO, J.P.; PIMENTA, J.; GOMES, R.; BARROSO, C.M.; PEREIRA, M.E.; PARDAL, M.A.; DUARTE, A. Can *Nassarius reticulatus* be used as a bioindicator of Hg contamination? Results from a longitudinal study of the Portuguese coastline. **Marine Pollution Bulletin**. v. 52, p. 674-680, 2006.

D'ASARO, C.N. Gunnar Thorson's world-wide collection of prosobranch egg capsules: Nassariidae. **Ophelia**. v. 38, n. 3, p. 149-215, 1993.

DEMAINTENON, M.J. Analysis of reproductive system ontogeny and homology in *Nassarius vibex* (Gastropoda: Buccinidae: Nassariinae). **Journal of Molluscan Studies**. v. 67, p. 37-49, 2001a.

DEMAINTENON, M.J. Ontogeny of the pseudohermafroditic reproductive system in *Nassarius vibex* (Gastropoda: Buccinidae: Nassariinae). **Journal of Molluscan Studies**. v. 67, p. 51-57, 2001b.

FELL, P. E. The concept of larvae. In: _____. **Embryology: constructing the organism**. Sunserland: Sinaur and Associates, 1997. cap. 2, p. 21-28.

FIORONI, P. Quelques aspects de l'embryogenèse des prosobranches (Mollusca: Gastropoda). **Vie et Milieu**. v. 18, p. 153-174, 1967.

FRETTER, V. The prosobranch veliger. **Proceedings of the Malacological Society of London**. v. 37, p. 357-366, 1967.

FRETTER, V.; GRAHAM, A. **British Prosobranch Molluscs (their functional anatomy and ecology)**. London: Royal Society of London, 1962. 755p.

FUNCEME. Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. Disponível em: <<http://www.funceme.br>>. Acesso em: 25 de maio de 2009.

GÉNIO, L.; SOUSA, A.; VAZ, N.; DIAS, J.M.; BARROSO, C. Effect of low salinity on the survival of recently hatched veliger of *Nassarius reticulatus* (L.) in estuarine habitats: A case study of Ria de Aveiro. **Journal of Sea Research**. v. 59, p. 133-143, 2008.

GÉRARD, C.; BLANC, A.; COSTIL, K. *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca: Hydrobiidae) in continental aquatic gastropod communities: impact of salinity and trematode parasitism. **Hydrobiologia**. v. 493, p. 167-172, 2003.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W. Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of Neogastropod molluscs. In: Biomonitoring of coastal waters and estuaries. Boca Raton: Edited by Kees J.M. Kramer. p. 205-226, 1994.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P.L.; BURT, G.R. The uses of dog-whelk *Nucella lapillus* in the pointer of tributyltin (TBT) contamination. **Journal of Marine Biological Association**. v. 67, p. 507-523, 1987.

GLAUBRECHT, M. Hard facts about soft animals. **Science**. v. 320, p. 1014-1015, 2008.

GRACHTRUP, M. The early development of the marine Prosobranch *Nassarius* (*Hinia*) *reticulatus* (Linnaeus). **Journal of Molluscan Studies**. v. 58, p. 65-77, 1991.

HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 846p.

HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? **Trends in Parasitology**. v. 17, n. 8, p. 363-368, 2001.

JENSEN, K.T.; FERREIRA, S.M.; PARDAL, M.A. Trematodes in a *Cyathura carinata* population from a temperate intertidal estuary: infections patterns and impact on host. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 84, p. 1151-1158, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1. ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 1983.123p.

KAICHER, S.D. A second ovoviviparous *Nassarius*. **Nautilus**. v. 85, p. 126-128, 1972.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: _____. KINNE, O. Diseases of marine animals. vol. 2, Hamburg: Biol. Anstalt. Helgol., 1983. pp. 477-961.

LEBOUR, M.V. The larval stages of *Nassarius reticulatus* and *Nassarius incrassatus*. p. 797-817, [1931 – 1939].

LIMA VERDE, F.B. **Caracterização histomorfológica do imposex em *Nassarius vibex* (Say, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Nassariidae) e monitoramento passivo do alcance da contaminação por compostos organoestênicos no estuário do Rio Ceará**. 2007. 59p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LIMA VERDE, F.B.; ROCHA-BARREIRA, C.A.; CASTRO, I.B. Caracterização do imposex em *Nassarius vibex* (Say, 1822) (Gastropoda, Nassariidae) no estuário do Rio Ceará, Fortaleza, Ceará. In CONGRESSO NORDESTINO DE ECOLOGIA, 11., 2006 Recife. **Anais...** CD-ROM.

MARSHALL D.J.; RAJKUMAR A. Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda). **Marine Pollution Bulletin**. v. 46, n. 9, p. 1150 – 1155, 2003.

MARTINS, M.F. **Expansão urbana e impactos ambientais: o caso da planície flúvio-marinha do rio Ceará**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MATTHEWS, H.R. Notas sobre a família Nassariidae no nordeste brasileiro (Mollusca: Gastropoda). **Arquivo Da Estação Biológica Marinha Da Universidade Federal do Ceará**. v.8, n.1, p. 141-143, 1968.

MCCANN-COLLIER, M. Microscopic observations of cryptic polar body production and spiralian organization in the egg of *Ilyanassa obsoleta*. **Biology Bulletin**. v. 167, p. 488-494, 1984.

MCGWYNNE, L.E.; VAN DER HORST, G. Patterns of reproduction in three sandy beach whelks of the genus *Bullia* Griffith. **Journal of Molluscan Studies**. v. 51, p. 190-197, 1985.

MEIRELLES, C.A.O.; CASTRO, I.B.; PINHEIRO, J.C.L. A first record of biphallia in imposexed females of *Leucozonia nassa* (Caenogastropoda: Fasciolariidae). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 2: Biodiversity Records**. v. 5424, p. 1-3, 2007.

MIRANDA, L.B.; CASTRO, B.M.; KJERFVE, B. **Princípios de Oceanografia Física de Estuários**. São Paulo: Edusp, 2002. 414p.

MIRANDA, P.T.C.; GURGEL, F.F.G.; LIBERATO, M.A.F.; OLIVEIRA, M.T.; ARRUDA, T.L.B. Comunidades bentônicas de raízes de *Rhizophora mangle* Linnaeus, no manguezal do Rio Ceará (Ceará – Brasil). **Arquivos de Ciências do Mar**. v. 27, p. 101-110, 1988.

OLABARRIA, C.; RAMIREZ-LLODRA, E. Reproductive strategies of two deep-sea gastropod species from the Porcupine Seabight (Northeast Atlantic). **Marine Biology**. 145: 541-549, 2004.

OLIVEIRA, A.M.E.; IRVING, M.A; LIMA, H.H. Aspectos bioecológicos do estuário do Rio Pacoti, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**. v. 27, p. 91-100, 1988.

PAVONI, B.; CENTANNI, E.; VALCANOVER, S.; FASOLATO, M.; CECCATO, S.; TAGLIAPIETRA, D. Imposex levels and concentrations of organotin compounds (TBT and its metabolites) in *Nassarius nitidus* from the Lagoon Venice. **Marine Pollution Bulletin**. v. 55, p. 505 – 511, 2007.

PECHENIK, J.A. Winter reproduction in the gastropod *Nassarius trivittatus*. **The Veliger**. v. 21, n. 2, p. 297-298, 1978.

PECHENIK, J.A.; FISHER, N.S. Feeding, assimilation and growth of mud snail larvae, *Nassarius obsoletus* (Say), on three different algal diets. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 38, p. 57-80, 1979.

QUEIROZ, L.R.; CASTRO, I.B.; ROCHA-BARREIRA, C.A. New Imposex Development Index (IDI) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): a transplantation experiment in Brazilian Northeast. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. v. 2, n. 3, p. 249-256, 2007.

RATO, M.; GASPAR, M.B.; TAKAHASHI, S.; YANO, S.; TANABE, S.; BARROSO, C. Inshore/offshore gradients of imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. **Marine Pollution Bulletin**. v. 56, p. 1323 – 1331, 2008.

RATO, M.; RUSSEL-PINTO, F.; BARROSO, C. Assessment of digenean parasitism in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: evaluation of possible impacts on reproduction and imposex expression. **Journal of Parasitology**. v. 95, n. 2, p. 327-336, 2009.

RIOS, E. **Seashells of Brazil**. 2. ed. Rio Grande: Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, 1994. 492p.

RITTSCHOF, D.; SAWARDECKER, P.; PETRY, C. Chemical mediation of egg capsule deposition by mud snails. **Journal of Chemical Ecology**. v. 28, n. 11, p. 2257-2269, 2002.

RODRÍGUEZ, J.G.; BELZUNCE, M.J.; BORJA, A.; FRANCO, J.; GARMENDIA, J.M.; GONZÁLEZ HERRÁIZ, I.; MUXICA, I.; SOLAUN, O.; TUEROS, I.; VALENCIA, V. Organotin bioaccumulation and imposex in female *Nassarius reticulatus* and *N. nitidus* in ports and marina areas of the Basque Country. In: Proceedings of the Annual Science Conference ICES CM 2007.

ROMERO, M.S.; VALDEBENITO, E.L. Larvas veliger de gastrópodos Prosobranchia provenientes de Punta de Lobos, Cuarta Región, Chile. **Revista Chilena de Historia Natural**. v. 75, p. 491-514, 2002.

RUPPERT. E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

RUSSEL-PINTO, F.; BARTOLI, P. *Cercaria sevellana* n. sp., a new cercaria (Digenea: Microphallidae) from *Nassarius reticulatus* (L.) (Mollusca: Prosobranchia) in Portugal. **Systematic Parasitology**. v. 53, p. 175-182, 2002.

RUSSEL-PINTO, F.; GONÇALVES, J. F.; BOWERS, E. Digenean larvae parasitizing *Cerastoderma edule* (Bivalvia) and *Nassarius reticulatus* (Gastropoda) from Ria de Aveiro, Portugal. **The Journal of Parasitology**. v. 92, n. 2, p. 319-332, 2006.

SASTRY, A.A. Effect of temperature on egg capsule deposition of the mud snail, *Nassarius obsoletus* (Say). **Veliger**. v. 13, p. 339-341, 1971.

SCHELL, S.C. **How to know the trematodes**. Dubuque: WMC Brown Company Publishers, 1970. 355p.

SHELTEMA, R.S. Pelagic larvae of New England intertidal gastropods I. *Nassarius obsoletus* Say and *Nassarius vibex* Say. **Transactions of American Microscopical Society**, v.81, n. 1, p. 1-11, 1962.

SHELTEMA, R.S.; SHELTEMA, A.H. Pelagic larvae of New England intertidal gastropods. III. *Nassarius trivittatus*. **Hydrobiologia**. v.25, n. 3-4, p. 321-329, 1964.

SCHMIEGELOW. J.M.M. **Planeta Azul. Uma introdução às ciências marinhas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 379p.

SHI, H.; HUANG, C.; YU, X.; ZHU, S. An updated scheme of imposex for *Cantharus cecillei* (Gastropoda: Buccinidae) and a new mechanism leading to the sterilization of imposex-affected females. **Marine Biology**. v. 146, p. 717-723, 2005.

SINDERMANN, C.J. **Principal diseases of marine fish and shellfish**. 2. ed. San Diego: Academic Press, Inc, 1990. 516p.

SMITH, B.S. Sexuality in American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. **Proceedings of Malacological Society of London**. v.39, p.377-378, 1971.

SOUSA, A.; MENDO, S.; BARROSO, C. Imposex and organotin contamination in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast. **Applied Organometallic Chemistry**. v. 19, p. 315-323, 2005.

VANNUCCI, M. What is so special about mangroves? **Brazilian Journal of Biology**. v. 61, n. 4, p. 599-603, 2001.

VERNBERG, W.B. Responses to estuarine stress In: _____. KETCHUM, B.H. **Estuaries and enclosed seas**. Amsterdam: Ed. Elsevier, 1992. 500p.

WEBBER, H.H. Gastropoda Prosobranchia. In: _____. **Reproduction of marine invertebrates, 4. Molluscs: Gastropods and Cephalopods**. London: Academic Press, 1977. p. 1-97.

WINTERBOURN, M.J. Larval trematoda parasitising the New Zealand of *Potamopyrgus* (Gastropoda: Hydrobiidae). **Mauri Ora**. v. 2, p. 17-30, 1973.