

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

GABRIEL DE SOUZA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FUMARATO DE TENOFOVIR
DESOPROXILA SOBRE *BIOMPHALARIA GLABRATA*, *IN VIVO* E *IN VITRO***

Belo Horizonte

2022

GABRIEL DE SOUZA SILVA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FUMARATO DE TENOFOVIR
DESOPROXILA SOBRE *BIOMPHALARIA GLABRATA*, *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Micheline Rosa Silveira.

Coorientadores: Dr. Marcos Paulo Gomes Mol;
Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Aparecida de Jesus Pereira.

BELO HORIZONTE

2022

S586a Silva, Gabriel de Souza.
Avaliação ecotoxicológica do fumarato de tenofovir desoproxila sobre *Biomphalaria glabrata* *in vivo* e *in vitro* [recurso eletrônico] / Gabriel de Souza Silva. – 2022.
1 recurso eletrônico (147 f. : il.) : pdf

Orientadora: Micheline Rosa Silveira.
Coorientadores: Marcos Paulo Gomes Mol.
Cíntia Aparecida de Jesus Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. HIV (vírus) – Tratamento – Teses. 2. Fármacos Anti-HIV – Teses. 3. Tenofovir – Teses. 4. Ecotoxicologia – Teses. 5. Toxicologia ambiental – Teses. 6. Metabolômica – Teses. 7. *Biomphalaria Glabrata* – Teses. 8. Hemócitos – Teses. I. Silveira, Micheline Rosa. II. Mol, Marcos Paulo Gomes. III. Pereira, Cíntia Aparecida de Jesus. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.704

FOLHA DE APROVAÇÃO

18/10/2022 15:45

SEI/UFMG - 1810250 - Folha



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**AValiação ECOTOXICOLÓGICA DO FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA SOBRE BIOMPHALARIA GLABRATA
IN VITRO E IN VIVO**

GABRIEL DE SOUZA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, área de concentração MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA.

Aprovada em 17 de OUTUBRO de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Micheline Rosa Silveira - Orientadora (FAFAR-UFMG)
Marcos Paulo Gomes Mol - Coorientador (FUNED)
Cintia Aparecida de Jesus Pereira - Coorientadora (UFMG)
Cristina Duarte Vianna Soares (UFMG)
Walter dos Santos Lima (UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **Micheline Rosa Silveira, Vice diretor(a) de unidade**, em 17/10/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walter dos Santos Lima, Professor do Magistério Superior**, em 17/10/2022, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Aparecida de Jesus Pereira, Professora do Magistério Superior**, em 17/10/2022, às 18:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Paulo Gomes Mol, Usuário Externo**, em 18/10/2022, às 08:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Duarte Vianna Soares, Subcoordenador(a)**, em 18/10/2022, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1810250** e o código CRC **260B1AA6**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pois é graças aos seus esforços que hoje estou aqui, concluindo mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À professora doutora Micheline Rosa Silveira, minha orientadora, pelo acolhimento, formação e amizade. Agradeço por todas as oportunidades, desafios, confiança e reconhecimento.

À professora doutora Cíntia Aparecida de Jesus Pereira, minha coorientadora, pela presença, ensinamentos e oportunidades.

Ao doutor Marcos Paulo Gomes Mol, meu coorientador e amigo. Aquele que mesmo longe, sempre esteve presente me auxiliando e abrindo portas em minha vida.

À doutora Consuelo Latorre Fortes Dias, pelo acolhimento, paciência, ensinamentos e todas as oportunidades que abriu em minha vida.

À professora doutora Andrea Frozino Ribeiro, por me apresentar o incrível mundo da ciência e me ensinar o verdadeiro significado de pesquisa.

A Ana do Carmo Valentim, minha amiga, minha “avó”. Por sempre estar presente nos momentos fáceis e difíceis da vida. Por sempre acreditar em mim e me incentivar.

A Universidade Federal de Minas Gerais, pela minha qualificação profissional.

A todos os membros do Laboratório de Saúde Pública/Água da Faculdade de Farmácia da UFMG: Fernanda, Geraldo, Mariângela e Vinícius.

Ao Laboratório de Helmintologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e ao Serviço de Ecotoxicologia do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento (DPD) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pelo suporte e parceria.

A todos os integrantes do Programa de Pós-graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais, corpo docente e discente, a quem fico lisonjeado por dele ter feito parte.

À CAPES pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho por meio da bolsa de pós-graduação.

À minha querida família. Verdadeiros guerreiros, que mesmo com tantos desafios, sempre se mantiveram de cabeça erguida. Aqueles que me proporcionaram o maior de todos os ensinamentos: respeito aos outros e humildade. Amo vocês!

A Deus pela minha vida e saúde.

EPIGRAFE

"A natureza pode suprir todas as necessidades do homem, menos a sua ganância"

Mahatma Gandhi

RESUMO

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) é um fármaco comumente utilizado no tratamento contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Devido a sua resistência a metabolização por sistemas biológicos, cerca de até 80% da dose do medicamento pode ser eliminada pela urina na forma inalterada dentro de 72 horas após administração. Tem-se conhecimento da presença do TDF em corpos de água superficiais e que o tratamento de esgoto convencional é ineficiente na eliminação desse fármaco e seus metabólitos. Mesmo assim, poucas informações sobre o impacto ambiental desse fármaco estão disponíveis na literatura científica. Deste modo, o objetivo com este trabalho foi avaliar os potenciais efeitos citotóxicos *in vitro* e *in vivo* do TDF sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* e seus hemócitos. Para realização do ensaio, foi realizada inicialmente uma análise *in vitro*, na qual os hemócitos foram expostos a diferentes concentrações do fármaco, durante 1 hora, e avaliados quanto sua viabilidade, atividade metabólica e fagocitose celular. Posteriormente, uma avaliação *in vivo* foi realizada, onde 30 moluscos por grupo eram expostos as mesmas concentrações *in vitro*, durante 72 horas (exposição aguda) e 21 dias (exposição crônica). Durante a exposição foram acompanhados diariamente e avaliados quanto a mortalidade e alterações comportamentais. Após a exposição, os moluscos foram sacrificados e sua hemolinfa coletada para avaliar a produção de óxido nítrico, atividade metabólica, fagocítica e viabilidade dos hemócitos. Os resultados obtidos pelo ensaio *in vitro* mostraram que o TDF é capaz de estimular significativamente a atividade fagocítica e metabólica dos hemócitos quando comparado ao controle, em concentrações superiores a 30 µg/L. Da mesma forma a partir do ensaio *in vivo*, esse mesmo estímulo foi observado em concentrações superiores a 30 mg/L, além do aumento da produção de óxido nítrico. Contudo, devido a persistência desse estímulo, um aumento de hemócitos inviáveis e uma redução de sua concentração na hemolinfa foi observado, após 21 dias de exposição. Por outro lado, em todas as concentrações testadas, não foi possível observar aumento na mortalidade do molusco, apenas mudanças comportamentais. A partir dos dados obtidos por este estudo, foi possível observar o resíduo de TDF nas concentrações 300 mg/L, 30 mg/L e 3 mg/L, é tóxica ao molusco a longo prazo. Além disso, a avaliação da hemolinfa revelou que essa exposição provoca uma redução significativa da concentração e viabilidade dos hemócitos circulantes.

Palavras-chave: ecotoxicidade; fumarato de tenofovir desoproxila; modelo biológico, *Biomphalaria glabrata*; hemócitos;

ABSTRACT

Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) is a drug commonly used in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV). Due to its resistance to metabolism by biological systems, up to 80% of the drug dose can be eliminated unchanged in the urine within 72 hours after administration. It is known that TDF is present in surface water bodies and that conventional sewage treatment is inefficient in eliminating this drug and its metabolites. Even so, little information about the environmental impact of this drug is available in the scientific literature. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential *in vitro* and *in vivo* cytotoxic effects of TDF on the snail *Biomphalaria glabrata* and its hemocytes. To perform the assay, an *in vitro* analysis was initially performed, in which the hemocytes were exposed to different concentrations of the drug, for 1 hour, and evaluated for its viability, metabolic activity and cellular phagocytosis. Subsequently, an *in vivo* evaluation was performed, where 30 snails per group were exposed to the same concentrations *in vitro*, for 72 hours (acute exposure) and 21 days (chronic exposure). During exposure, they were monitored daily and evaluated for mortality and behavioral changes. After exposure, the snails were sacrificed and their hemolymph collected to assess nitric oxide production, metabolic and phagocytic activity and hemocyte viability. The results obtained by the *in vitro* assay showed that TDF is capable of significantly stimulating the phagocytic and metabolic activity of hemocytes when compared to the control, at concentrations higher than 30 $\mu\text{g/L}$. Likewise, from the *in vivo* assay, this same stimulus was observed at concentrations above 30 mg/L , in addition to an increase in nitric oxide production. However, due to the persistence of this stimulus, an increase in nonviable hemocytes and a reduction in their concentration in the hemolymph was observed after 21 days of exposure. On the other hand, at all concentrations tested, it was not possible to observe an increase in snail mortality, only behavioral changes. From the data obtained by this study, it was possible to observe the TDF residue at concentrations of 300 mg/L , 30 mg/L and 3 mg/L it is toxic to the snail in the long term. Furthermore, the evaluation of hemolymph revealed that this exposure causes a significant reduction in the concentration and viability of circulating hemocytes.

Key words: ecotoxicity; tenofovir desoproxil fumarate; biological model; *Biomphalaria glabrata*; hemocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo ilustrativo das possibilidades de biomarcadores utilizando o molusco de água doce <i>Biomphalaria glabrata</i> como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos.	29
Figura 2. Fluxograma (PRISMA) de cada etapa do processo de triagem de artigos nas bases de dados ScienceDirect, PubMed e SciELO.	35
Figura 3. Linha do tempo de um breve histórico do uso de <i>Biomphalaria glabrata</i> como modelo biológico.	36
Figura 4. Características de manutenção e criação do molusco de água doce <i>Biomphalaria glabrata</i> adotadas pelos estudos de ecotoxicidade incluídos nesta revisão.	46
Figura 5. Fotografia do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> linhagem Belo Horizonte. ...	75
Figura 6. Estrutura química do Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF).	78
Figura 7. Imagem representativa da câmara de Neubauer.	80
Figura 8. Fotografia de dois moluscos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	84
Figura 9. Hemócito lisado de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposto ao álcool 70% e corado com Azul de Tripán.	88
Figura 10. Fotografia exemplificando o processo de coleta da hemolinfa sobre a concha do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> para posterior obtenção dos hemócitos	89
Figura 11. Microfotografia de hemócitos, tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após coloração com 0,4% de Azul de Tripán.	91
Figura 12. Análise de viabilidade dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> pelo ensaio de exclusão do corante Azul Tripán, após exposição ao TDF por 1, 3, 6 e 24 horas.	91
Figura 13. Microfotografia de hemócitos, realizada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após coloração com 0.33% de vermelho neutro.	93

Figura 14. Atividade metabólica (ensaio de MTT) de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos por diferentes tempos, <i>in vitro</i> . Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata).	94
Figura 15. Microfotografia de hemócitos, tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após 3 horas de incubação com MTT e solubilização com DMSO.....	97
Figura 16. Microfotografia de hemócito do tipo granulócito de <i>Biomphalaria glabrata</i> , tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após uma hora de incubação com TDF 300 mg/L e uma hora de incubação com micropartículas de dióxido de silício.	98
Figura 17. Microfotografia de hemócito do tipo granulócito de <i>Biomphalaria glabrata</i> , tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após uma hora de incubação com TDF.....	101
Figura 18 - Inviabilidade dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao aumento das concentrações de TDF por uma hora (<i>in vitro</i>) (A) e 21 dias (<i>in vivo</i>) (B).	122
Figura 19. Resultado da análise de atividade metabólica dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após exposição ao TDF	123
Figura 20 - Atividade metabólica dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao aumento das concentrações de TDF por uma hora (<i>in vitro</i>) (A) e 21 dias (<i>in vivo</i>) (B).	124
Figura 21. Resultado da análise de óxido nítrico quantificado na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> após exposição ao TDF.....	125
Figura 22 - Produção de óxido nítrico de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao aumento das concentrações de TDF por 21 dias <i>in vivo</i>	125
Figura 23 - Atividade fagocítica dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao aumento das concentrações de TDF por uma hora <i>in vitro</i>	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de <i>Biomphalaria glabrata</i> como modelo biológico em estudos ecotoxicológicos.	37
Tabela 2. Estudos selecionados utilizando <i>Biomphalaria glabrata</i> como modelo biológico potencial para estudos de ecotoxicidade.....	39
Tabela 3. Resumo dos requisitos para realização de ensaios de ecotoxicidade utilizando o molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> como modelo biológico.	57
Tabela 4. Preparo da solução salina balanceada de Chernin.	78
Tabela 5. Exemplo de opções de suplementação alimentar para <i>Biomphalaria glabrata</i>	82
Tabela 6. Características físico-químicas e microbiológicas da água do aquário de criação dos moluscos de cinco amostras distintas coletadas antes dos experimentos....	83
Tabela 7. Comparação entre a composição química das soluções CBSS e PBS.....	86
Tabela 8. Contagem total e diferencial celular (média + desvio padrão) de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	93
Tabela 9. Atividade metabólica de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> incubados por uma hora com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorvância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por uma hora.....	95
Tabela 10. Atividade metabólica de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> incubados por três horas com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorvância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por três horas.....	96
Tabela 11. Atividade metabólica de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> incubados por seis horas com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorvância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por seis horas.	96

Tabela 12. Atividade metabólica de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> incubados por 24 horas com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por 24 horas.	97
Tabela 13. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após uma hora de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.....	99
Tabela 14. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após três horas de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.....	100
Tabela 15. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após vinte e quatro horas de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.....	100
Tabela 16. Avaliação da qualidade da água do aquário de criação dos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> utilizada neste estudo	118
Tabela 17. Mortalidade e análise comportamental de <i>Biomphalaria glabrata</i> (n = 30) expostos por 21 dias ao TDF	119
Tabela 18. Viabilidade e concentração total de hemócitos (média + desvio padrão) presentes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após 72 horas de exposição.	120
Tabela 19. Viabilidade e concentração total de hemócitos (média + desvio padrão) presentes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após 21 dias de exposição.	120
Tabela 20. Contagem total e diferencial de células (média + desvio padrão) circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após uma hora de exposição.....	121
Tabela 21. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após 21 dias de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.....	126

Tabela 22. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, após uma hora de exposição ao Fumarato de Tenofovir
Desoproxila..... 127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TDF – Fumarato de Tenofovir Desoproxila

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Humana

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

mg/L - miligrama por litro

µg/L - micrograma por litro

ng/L - nanograma por litro

mg/mL - miligrama por mililitros

g/mol - grama por mol

mm – milímetro

Mb – Megabase

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol

CAPI - Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

BH – Belo Horizonte

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

FAFAR – Faculdade de Farmácia

PPGMAF – Programa de Pós-graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica

MTT - Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

ROS - espécies reativas de oxigênio

BgMIF - Fator inibidor da migração de macrófagos em *Biomphalaria glabrata*

MIF - Fator inibidor da migração de macrófagos

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-17 - Interleucina 17

PRISMA – *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

pH – potencial hidrogeniônico

cm² - centímetro quadrado

CL50 - Concentração letal para 50% dos indivíduos

EC50 - Concentração efetiva para 50% dos indivíduos

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio

RNA - Ácido Ribonucleico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

NMs - Nanomateriais

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

g - grama

mOsm/L – osmoles por litro

SUMÁRIO

1 ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	18
CAPÍTULO 1	19
2 INTRODUÇÃO.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 – Fumarato de Tenofovir Desoproxila.....	21
3.2 – Presença de antivirais no ambiente aquático	22
3.3 – Testes ecotoxicológicos.....	23
3.4 – <i>Biomphalaria glabrata</i>	24
3.5 – Sistema interno de defesa dos moluscos.....	25
3.6 – Hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i>	25
4 JUSTIFICATIVA	27
5 OBJETIVOS.....	28
5.1 – Objetivo geral	28
5.2 – Objetivos específicos.....	28
CAPÍTULO 2 - Utilização do molusco de água doce <i>Biomphalaria glabrata</i> como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos: uma revisão sistemática.....	29
CAPÍTULO 3 - Padronização <i>in vitro</i> do ensaio de citotoxicidade utilizando os hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> como marcador biológico para estudos ecotoxicológicos de resíduos farmacêuticos.....	73
CAPÍTULO 4 - Avaliação ecotoxicológica do antirretroviral Fumarato de Tenofovir Desoproxila sobre o molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> e seus hemócitos	110
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
REFERÊNCIAS	139

1. ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi desenvolvida no formato de artigos. O capítulo 1 foi elaborado para apresentar uma breve introdução, revisão bibliográfica, justificativa e os objetivos gerais e específicos do trabalho. No capítulo 2, é apresentada uma revisão sistemática da literatura onde aborda-se os principais estudos envolvendo o molusco *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos envolvendo potenciais substâncias presentes no ambiente aquático, sejam elas solúveis ou insolúveis em água. Este capítulo está submetido e em processo de revisão na revista *Environmental Science and Pollution Research* e publicado como *preprint* na plataforma *Research Square* disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2058359/v1>. A partir dos dados obtidos pela revisão, no capítulo 3, é apresentado um estudo experimental onde foi padronizado os métodos para avaliações ecotoxicológicas, *in vitro*, utilizando o TDF como substância teste e os hemócitos do molusco *Biomphalaria glabrata* como bioindicador. No capítulo 4, é apresentado um estudo experimental, que está em fase de ajustes para submissão à revista *Environmental Monitoring and Assessment*, onde aborda-se os métodos padronizados para estudo ecotoxicológicos com o molusco *Biomphalaria glabrata* e os principais efeitos do TDF na exposição, *in vivo* e *in vitro*.

CAPÍTULO 1

2. INTRODUÇÃO

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) é um fármaco comumente utilizado no tratamento contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). É um diéster fosfonato do nucleosídeo acíclico análogo da adenosina monofosfato que requer uma hidrólise inicial do diéster para conversão para tenofovir e posteriormente fosforilações para formar tenofovir difosfato, o metabólito ativo do TDF. Esse metabólito formado inibe a atividade da transcriptase reversa do HIV através da competição com o substrato natural (desoxiadenosina 5'-trifosfato) e após sua incorporação no DNA, provoca a interrupção da cadeia do DNA impedindo a replicação viral (DeChristoforo & Penzak, 2004).

Como consequência da sua utilização, somada ao descarte inadequado do mesmo, tem-se conhecimento da presença desse antirretroviral em corpos de água superficiais usados para o abastecimento de populações (Wood *et al.*, 2015). Essa presença desses contaminantes em corpos de água têm se tornado uma preocupação mundial, uma vez que existem poucas informações sobre o impacto ambiental. Por este motivo, a contaminação ambiental aquática pelos resíduos farmacêuticos tem sido alvo de inúmeros estudos, por apresentarem efeitos ambientais imprevisíveis, colocando em risco inúmeras formas de vida (Fabbri, 2015; Agunbiade & Moodley, 2016; Rzymiski *et al.*, 2017).

Com o aumento do número de estudos, foi possível observar a presença de diversos fármacos em corpos de água, como antibióticos (Wagil *et al.*, 2014; Hanna *et al.*, 2018), antivirais (Wood *et al.*, 2015), analgésicos (Caban *et al.*, 2015), antidepressivos (Giebułtowicz & Nałęcz-Jawecki, 2014), contraceptivos (Kot-Wasik *et al.*, 2016), entre outros. Mesmo que tenham sido detectadas em concentrações muito baixas no ambiente aquático, essa contaminação pode causar danos e atingir a população humana de forma direta ou indireta (Rzymiski *et al.*, 2017).

Vários estudos apresentam uma relação direta entre saúde pública e meio ambiente, onde é possível observar patologias humanas associadas com as más condições ambientais (Jassal *et al.*, 2013; Tulchinsky & Varavikova, 2014; Lanrigan *et al.*, 2020). A poluição das águas pode promover a proliferação de patógenos que causam doenças gastrointestinais (Nath, 2003), além de conter substâncias tóxicas para saúde humana (Hussain *et al.*, 2016). O esgoto, lançado inapropriadamente em corpos de água, pode

conter fezes contaminadas e favorecer a disseminação de hepatite, giardíase e outras doenças infecciosas (Mons *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2013).

Existe uma grande quantidade de antirretrovirais disponíveis para consumo humano e animal, contudo, desconhecem-se quais são consumidos por região epidemiológica, dificultando a prevenção ou estimativa da quantidade liberada no meio ambiente. Em 2016, 19,8 milhões de pessoas participaram de programas de terapia antirretroviral, o que equivale a um consumo diário de 21,78 toneladas de antirretrovirais, sendo 5,94 toneladas de tenofovir (Ncube *et al.*, 2018).

Em 2019, estimava-se que a prevalência de HIV em adultos na população brasileira era de 0,5%, 920 mil pessoas, das quais 630 mil faziam uso de medicamentos para tratar a doença (UNAIDS, 2019). Com o objetivo de reduzir a epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS), o Brasil adotou uma estratégia na qual disponibilizou gratuitamente o acesso ao tratamento antirretroviral, sendo que o medicamento Tenofovir prescrito para as pessoas vivendo com HIV no Brasil (Galvão, 2005). O Tenofovir foi aprovado pela *Food and Drug Administration*, em 2001, na forma de Fumarato de Tenofovir Desoproxila para o tratamento da AIDS, sendo o primeiro fármaco liberado para uso como um análogo de nucleotídeo inibidor da transcriptase reversa do HIV (Broder, 2009; Masho *et al.*, 2007). Como resultado da adoção da terapia antirretroviral, a expectativa de vida das pessoas infectadas pelo vírus da AIDS tende a aumentar (Teeraananchai *et al.*, 2016).

Devido a liberação desses resíduos no ambiente aquático, mesmo com a capacidade do ecossistema de reduzir os efeitos danosos por meio da biodegradação e autodepuração, surge a necessidade de desenvolvimento de métodos eficientes e viáveis para o tratamento de efluentes industriais e urbanos (Kümmerer, 2009; Luo *et al.*, 2014; Daouk *et al.*, 2015; Ncube *et al.*, 2018). Uma dessas formas de tratamento é por meio da utilização de organismos como algas (Tolboom *et al.*, 2019) e microrganismos capazes de utilizar a matéria orgânica na água como fonte nutricional, a fim de reduzir a poluição do meio (Silva *et al.*, 2019). Além da utilização de organismos vivos, a radiação ultravioleta mostrou-se capaz de remover completamente a presença de alguns fármacos antirretrovirais da água (Russo *et al.*, 2018).

Existem diversos estudos que identificaram a presença de compostos usados no combate do HIV, e outros compostos, em corpos de água, como resultado da liberação

pelos esgotos (Prasse *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2014 (a); Peng *et al.*, 2014 (b); Wood *et al.*, 2015). Contudo, não existem estudos que avaliam diretamente o impacto desses resíduos sobre moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Outro ponto importante é que o tratamento convencional de águas residuais pode resultar em modificação dos resíduos farmacêuticos (Shen & Andrews, 2011; Soufan *et al.*, 2012; Huerta-Fontela *et al.*, 2012; Acero *et al.*, 2013) e que alguns deles, podem gerar subprodutos tóxicos (Bedner & MacCrehan, 2006) como resultado da cloração, indicando que alguns tratamentos podem agravar o impacto desses resíduos no meio.

Levando em consideração a presença do resíduo farmacêutico TDF em águas superficiais utilizadas para o abastecimento humano, somada a baixa eficiência na sua remoção pelo tratamento tradicional de esgoto, o presente trabalho propôs avaliar os potenciais efeitos citotóxicos desse resíduo sobre o molusco da espécie *Biomphalaria glabrata* e seus hemócitos, a fim de entender a sua ecotoxicidade no meio ambiente aquático.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Fumarato de Tenofovir Desoproxila

Desde 2001, o fármaco Fumarato de Tenofovir desoproxila (TDF), vem sendo utilizado mundialmente, como medicamento de uso oral, para o tratamento contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), como um análogo de nucleotídeo inibidor da transcriptase reversa do HIV (Masho *et al.*, 2007). Quando comparado a outros fármacos de mesma classe, o TDF apresenta elevada eficácia na redução da carga viral (Meintjes *et al.*, 2017) e é um dos poucos que desempenha atividade contra o HIV1 e 2 (Kearney *et al.*, 2004; Andreatta *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2015), subtipos diferentes do vírus sendo o subtipo 1 comumente encontrado pelo mundo e o subtipo 2 na África Ocidental. Bloqueando a transcriptase reversa, enzima necessária para a reprodução viral, o TDF permite o gerenciamento da carga viral do HIV por meio da diminuição da replicação viral (Murphy & Valentovic, 2017).

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila ($C_{19}H_{30}N_5O_{10}P.C_4H_4O_4$) (Figura 1), de nomenclatura química fumarato de 9-[(R)-2-[[bis[[isopropoxicarbonil]oxi]metoxi]fosfonil]metoxi]propil] adenina, é um sal do ácido fumárico do bis-

isopropoxicarboniloximetil éster derivado do Tenofovir com aparência de um pó cristalino branco, peso molecular de 635,52 g/mol, solúvel até 13,4 mg/mL de água destilada a 25 °C (Fung *et al.*, 2002; DeChristoforo & Penzak, 2004; Leite *et al.*, 2015).

Para desempenhar suas ações antivirais, o TDF requer uma hidrólise inicial do tenofovir disoproxila, por meio de enzimas plasmáticas, para conversão na substância ativa, Tenofovir, que é absorvida pelas células. Em seguida, ocorrem fosforilações subsequentes por quinases celulares para formar o metabólito ativo tenofovir difosfato. Esse metabólito desempenha a ação antiviral inibindo a atividade da transcriptase reversa do HIV, competindo com o substrato adenosina 5' monofosfato, ligando-se irreversivelmente a transcriptase reversa e causando a terminação da cadeia do DNA (DeChristoforo & Penzak, 2004; Silva *et al.*, 2019).

Além do descarte inadequado, o consumo do fármaco pela população contribui para a contaminação aquática desse resíduo. O TDF é uma molécula muito polar, limitando sua absorção oral e quando desesterificada, no trato gastrointestinal, faz com que o fármaco apresente 25% de biodisponibilidade por via oral (Geboers *et al.*, 2015; Moss *et al.*, 2017). Além disso, suas características indicam uma grande resistência a metabolização por sistemas biológicos, uma vez que, até 80% da dose do medicamento absorvida pode ser eliminada pela urina na forma inalterada dentro de 72 horas após administração (Kearney *et al.*, 2004; Murphy & Valentovic, 2017).

3.2 – Presença de antivirais no ambiente aquático

Nos últimos anos, o uso de antivirais utilizados pela população aumentou. Assim como outros fármacos, os antivirais podem ou não ser completamente metabolizados e excretados pelas fezes ou urina dos pacientes, que por meio do esgoto urbano e/ou hospitalar chegam até o meio ambiente, gerando potenciais danos negativos ao ecossistema (Mahmood *et al.*, 2019). Essa contaminação se deve ao fato de que algumas estações de tratamento de esgotos não se mostram eficientes para a remoção total desses resíduos, visto que não foram projetadas para remover moléculas complexas, justificando sua baixa eficiência na remoção (Badawy *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2015).

Por este motivo, o monitoramento de resíduos farmacêuticos nos efluentes e corpos d'água deve ser priorizado, pelo fato de que seus efeitos sobre organismos

aquáticos não são conhecidos, apontando a necessidade da implementação de tratamentos de esgoto complementares para reduzir a entrada desses resíduos nos nestes ambientes (Silva *et al.*, 2019). Há alguns anos, foram detectadas concentrações (145 – 243 ng/L) de Tenofovir em rios da África do Sul, comprovando a necessidade de desenvolver métodos aprimorados para detectar resíduos farmacêuticos e avaliar sua toxicidade e bioacumulação, no meio aquático (Wood *et al.*, 2015).

Tendo o conhecimento sobre a presença do TDF em corpos de água, somada a falta de estudos sobre seu impacto ecotoxicológico no meio ambiente aquático (Silva *et al.*, 2019), buscar conhecer os efeitos desse fármaco sobre algumas espécies aquáticas torna-se necessária para estimar o impacto da sua presença neste meio (Ghosh *et al.*, 2017).

3.3 – Testes ecotoxicológicos

Os ensaios ecotoxicológicos baseiam-se na exposição de indivíduos ou células teste a uma determinada substância sob condições controladas, como tempo e concentração, com objetivo de observar alterações nos organismos (Costa *et al.*, 2008). Esses testes são rápidos e de baixo custo, tornando-se importantes para avaliar os efeitos de contaminantes no meio ambiente. Por este motivo, o uso desses bioensaios no estudo da qualidade da água é essencial para obter uma estimativa dos efeitos de resíduos em fontes de água que possam representar um risco para a vida (Villegas-Navarro *et al.*, 1997).

Por um lado, os testes de ecotoxicologia procuram se aproximar ao máximo das condições ambientais através de ensaios controlados em laboratório, ajudando assim a analisar e interpretar os resultados obtidos. Por outro, esses testes são realizados em ambiente artificial, o que impossibilita a generalização de seus resultados ao nível do ecossistema, pois este se limita a organismos de teste específicos (Costa *et al.*, 2008). Contudo, mesmo com a utilização de vários organismos nos ensaios ecotoxicológicos no Brasil, ainda há a necessidade de ampliação destes ensaios envolvendo outros organismos, como os moluscos. Ainda existem poucos dados a respeito do tema e maiores estudos com moluscos devem ser realizados para suprir essa escassez de dados. Dentre esses moluscos, destaca-se o gênero *Biomphalaria*, que são seres com grande distribuição

e relevância na saúde pública no Brasil e por possuírem uma biologia bem compreendida (Barbosa & Barbosa, 1994).

3.4 – *Biomphalaria glabrata*

Biomphalaria glabrata é uma espécie de molusco herbívoro da família Planorbidae, de água doce. Quando adultos, sua concha apresenta um diâmetro máximo de 40 mm, com 11 mm de largura, com uma depressão central em cada face da concha e um total de seis ou sete voltas (Tibiriçá *et al.*, 2009). No Brasil, possui grande importância em saúde pública sendo considerado o principal hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, causador da doença esquistossomose (Giovanelli *et al.*, 2001; Paraense, 2008) e, dentro das espécies transmissoras, o *Biomphalaria glabrata* é a mais suscetível a infectar-se com todos como linhagens geográficas do *S. mansoni* (Dias *et al.* 1987).

Além disso, são seres hermafroditas e seu sistema genital é capaz de fornecer as características morfológicas mais importantes para a sua identificação dos demais planorbídeos (Paraense, 2008). Dentre as inúmeras características que favorecem sua utilização como modelo biológico teste, o *Biomphalaria glabrata* possui alta reprodutividade, sensibilidade a alterações do meio e relevância clínica. Não é apenas a biologia morfológica que é bem compreendida nestes animais, mas também a sua biologia funcional, como a embriologia e o sistema interno de defesa. Por estes motivos, os moluscos desse gênero vêm sendo utilizados como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos, avaliando não apenas substâncias solúveis no meio, mas também substâncias pouco solúveis (Oliveira-Filho *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020).

Os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* têm sido utilizados como modelo de indicador ambiental de diversos contaminantes (Siqueira *et al.*, 2020). Por meio do qual é possível avaliar alterações quanto a sua capacidade reprodutiva e sobrevivência de indivíduos adultos e/ou embriões, caracterizando sua sensibilidade e vulnerabilidade a diversos resíduos no ambiente aquático (Lima *et al.*, 2019). Assim, a avaliação das más formações embrionárias pode indicar um dos possíveis efeitos da indução de mutações em células germinativas. Porém, para utilizar apropriadamente esse biomarcador, é necessário distinguir as más formações nas células germinativas comparando com embriões sem tratamento.

3.5 – Sistema interno de defesa dos moluscos

Os invertebrados são seres capazes de desenvolver respostas celulares e humorais, como aglutininas, inatas frente a patógenos invasores, respondendo a todo tipo de agressão (Rowley & Powell, 2007). Essa resposta é desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) os quais são reconhecidos pelas células do sistema interno de defesa como sinal de invasão por um agente estranho (Loker *et al.* 2004). Apesar de não apresentarem resposta desencadeada por anticorpos como os vertebrados, o sistema interno de defesa dos invertebrados é capaz de reconhecer e responder a agentes patógenos (Van Der Knaap & Loker, 1990).

Mesmo com essa diferença no desencadeamento da resposta de defesa, sabe-se que existem muitas semelhanças entre a resposta de defesa inata dos invertebrados com o sistema de defesa interno dos vertebrados (Hoffmann, 2003) como: peptídeos de clivagem, células fagocitárias e moléculas de reconhecimento de padrões moleculares altamente conservados. Embora semelhanças tenham sido encontradas, é importante notar que o sistema e os mecanismos de defesa não são iguais (Loker *et al.* 2004).

O sistema de defesa interno dos moluscos é composto principalmente pelos hemócitos, amebócitos, e por fatores solúveis presentes na hemolinfa (Van Der Knaap & Loker, 1990; Sokolova, 2009). A hemolinfa é um fluido corporal que circula em um sistema semiaberto no corpo dos moluscos constituída por água, sais e compostos orgânicos (Shumway, 1977), que apesar da semelhança com o sangue dos vertebrados, apresenta uma composição química e celular própria desempenhando diferentes funções, como transporte e armazenamento de nutrientes (Nicolai *et al.*, 2012).

3.6 – Hemócitos de *Biomphalaria glabrata*

Os hemócitos são células com origem multicêntrica, sendo observado produção em vários tecidos hematopoiéticos, presentes na hemolinfa (Souza & Andrade, 2006), com a função principal de defesa dos moluscos. Essas células possuem morfologia e conteúdo enzimático variável, compostos por diferentes subpopulações que apresentam diferentes tipos de resposta de defesa (Cavalcanti *et al.*, 2012). Os hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* são compostos, principalmente, por pelo menos duas populações celulares, baseadas nas suas características morfológicas e funcionais: hialinócitos e granulócitos (Lo Verde *et al.*, 1982). Essas células, desempenham um papel

central importante na imunidade inata destes moluscos estando envolvidos no reconhecimento de corpos estranhos, respostas de encapsulamento, fagocitose e reações citotóxicas (Matricon-Gondran & Letocart, 1999; Johnston & Yoshino, 2001).

A caracterização de hemócitos circulantes em *Biomphalaria* tem sido descrita por vários autores (Sminia, 1981; Matricon-Gondran e Letocart, 1999; Johnston e Yoshino 2001). Contudo, diferentemente dos relatos anteriores, quando caracterizado as células enquanto vivas, sem fixação na lâmina, foi observado que *Biomphalaria glabrata* (linhagem BH) possuem têm três subconjuntos principais de hemócitos circulantes, classificados de acordo com o tamanho dos grânulos intracelulares, pequenos, médios e grandes (Martins-Souza *et al.*, 2009).

Posteriormente, com o avanço dos estudos morfológicos dessas células, por meio da microscopia eletrônica, foi possível diferenciar essas células em cinco tipos morfológicos, sendo elas bastonetes, granulócitos, hialinócitos tipo I, II e III (Cavalcanti *et al.*, 2012). Os bastonetes são células jovens ou precursoras que representam 45% da população total de hemócitos. Os granulócitos, são células polimórficas que representam 4% da população total de hemócitos, possuindo vários grânulos densos distribuídos no citoplasma. As células hialinócitos são mais abundante e compreendem mais da metade da população total de hemócitos circulantes na hemolinfa do *Biomphalaria glabrata* (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Além disso, os hemócitos são capazes de secretar fatores solúveis que participam do mecanismo interno de defesa do molusco. Vasquez e Sullivan (2001) mostraram que a hemolinfa livre de células coletada de *Biomphalaria glabrata* foi capaz de diminuir a taxa de infecção de *S. mansoni* nos receptores. Essa participação de elementos solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, como as lectinas, no mecanismo de reconhecimento foi inicialmente sugerida por Fryer e Bayne (1996). Posteriormente, Sapp e Loker (2000) mostraram que a hemolinfa é capaz de desempenhar um efeito direto na imunidade do molusco. Por fim, pode-se dizer que o sistema interno de defesa dos moluscos consiste principalmente por fatores solúveis na hemolinfa e porções celulares de hemócitos (Pereira *et al.*, 2008).

4. JUSTIFICATIVA

Resíduos farmacêuticos representam risco para incontáveis espécies, principalmente do meio aquático. Além disso, vários trabalhos apresentam a relação direta entre saúde pública e ambiente, onde é possível observar patologias humanas associadas com más condições ambientais. Pesquisas dirigidas a avaliação dos impactos ecotoxicológicos de resíduos farmacêuticos no meio ambiente por meio de modelos biológicos são essenciais para proteger não apenas o ambiente, mas também a saúde pública. Esta linha de pesquisa está em ascensão, mobilizando pesquisadores de todo o mundo com objetivo de compreender melhor os efeitos desses resíduos sobre o ecossistema aquático. Assim como a academia, o setor farmacêutico possui responsabilidade na produção de conhecimentos sobre o impacto ambiental desses contaminantes emergentes. Estes estudos podem contribuir para a preservação de espécies com minimização dos riscos ao ambiente aquático e à saúde humana decorrentes da exposição a resíduos de fármacos. A partir deste trabalho, foi possível compreender melhor os efeitos do Tenofovir no ambiente aquático utilizando pela primeira vez o molusco como modelo biológico. Desta forma, o tema torna-se relevante pois contribui para o desenvolvimento da saúde coletiva e permite a realização e divulgação científica ganhando maior visibilidade internacional. Além disso, os resultados gerados podem contribuir para um maior conhecimento e padronização de técnicas que permitam a avaliação de outros resíduos farmacêuticos, no ambiente aquático, utilizando como modelo biológico o molusco *Biomphalaria glabrata*. Os dados gerados disponibilizaram novo modelo de análise de ecotoxicidade, bem como uma forma de identificar os efeitos ambientais negativos de fármacos, servindo de embasamento para o desenvolvimento de métodos de tratamento de efluentes, tanto pela academia quanto pela indústria, minimizando a entrada desses resíduos no ambiente. Outro ponto importante é que este trabalho envolveu uma equipe interdisciplinar da UFMG com participação e colaboração do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e da Faculdade de Farmácia (FAFAR), bem como da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Desta forma, o presente trabalho fornece informações necessárias para futuras aplicação de outros fármacos e oferece uma excelente alternativa para estudos de bioacumulação e genotoxicidade ambientais.

5. OBJETIVOS

5.1 – Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos citotóxicos *in vitro* e *in vivo* do Fumarato de Tenofovir Desoproxila sobre o molusco da espécie *Biomphalaria glabrata*, assim como os seus hemócitos, a fim de entender a ecotoxicidade da presença aquática por este resíduo farmacêutico.

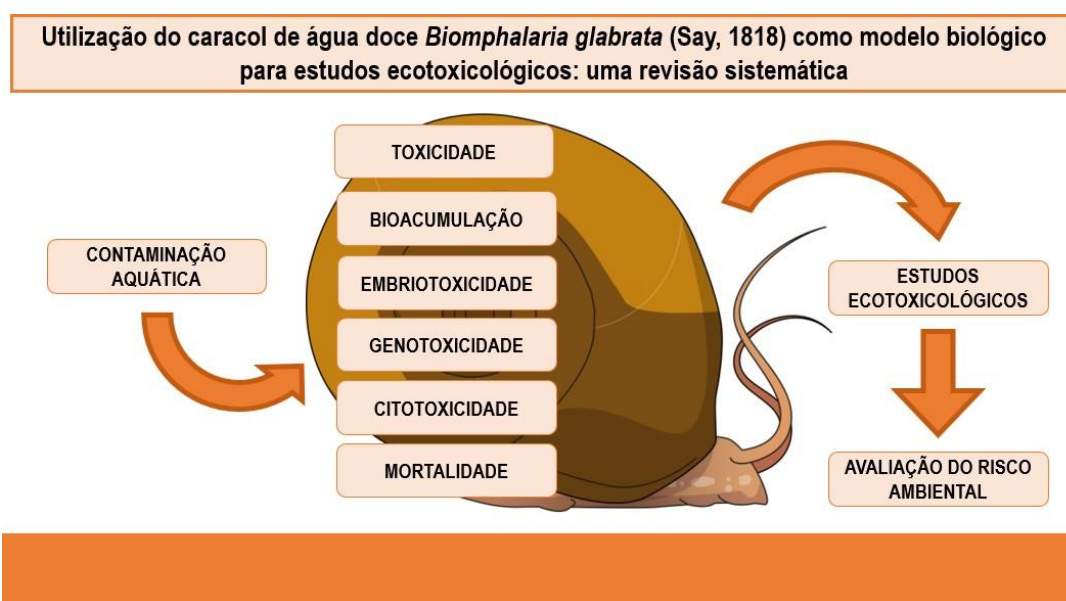
5.2 – Objetivos específicos

- Desenvolver e produzir uma revisão sistemática sobre a utilização do molusco *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos apresentando os principais ensaios utilizados e os efeitos de potenciais substâncias presentes no meio ambiente aquático.
- Avaliar a citotoxicidade celular sobre hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, por meio do ensaio de MTT, sobre estímulo do antirretroviral TDF em diferentes concentrações *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar os níveis de óxido nítrico na hemolinfa do *Biomphalaria glabrata* após exposição *in vivo*, ao fármaco TDF, utilizando o reagente de Greiss;
- Avaliar a viabilidade dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após a exposição do TDF, *in vivo* e *in vitro*, utilizando o corante Azul de Tripán 0,4%;
- Quantificar, microscopicamente, a população de hemócitos (hialinócitos e granulócitos) presentes na hemolinfa, após exposição *in vivo* e *in vitro* ao TDF, utilizando o corante Vermelho Neutro 0,33%;
- Avaliar a mortalidade e comportamento do molusco *Biomphalaria glabrata*; após exposição *in vivo* ao fármaco por 72 horas (exposição aguda) e 21 dias (exposição crônica).
- Avaliar o índice de fagocitose dos hemócitos após exposição, *in vivo* e *in vitro*, do TDF utilizando micropartículas de dióxido de silício de 1 µm de diâmetro.

CAPÍTULO 2: Utilização do molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos: uma revisão sistemática

RESUMO ILUSTRATIVO

Figura 1. Resumo ilustrativo das possibilidades de biomarcadores utilizando o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos.



Fonte: Autor.

RESUMO

Ao longo do tempo, tem-se observado um crescente aumento de poluentes humanos no ambiente aquático. A presença global de resíduos em corpos d'água reforça a necessidade de desenvolver métodos aprimorados para detectá-los e avaliar seus efeitos ecotoxicológicos no ambiente aquático. Assim, neste trabalho teve-se como objetivo apresentar os principais ensaios utilizando *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos. Realizamos uma revisão sistemática da literatura com dados publicados até junho de 2022 nas bases de dados *ScienceDirect*, PubMed e SciELO. Vinte e seis estudos foram selecionados para esta revisão após a triagem. O molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* tem sido estudado como modelo ecotoxicológico para diferentes substâncias por meio de ensaios de toxicidade,

embriotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade. Estudos avaliando o impacto da exposição de *Biomphalaria glabrata* a várias substâncias relataram efeitos tóxicos, comportamentais, reprodutivos e sobre seus descendentes. Nesta revisão são apresentados diversos ensaios utilizando *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos. O crescente número de estudos realizados com o molusco fornece uma prévia do seu potencial como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Saúde Ambiental; *Biomphalaria glabrata*; Ecotoxicologia; Molusco.

INTRODUÇÃO

Muitos micropoluentes humanos foram detectados no ambiente aquático (Reid *et al.*, 2019), muitas vezes devido à remoção ineficiente durante o tratamento convencional de águas residuais (Golovko *et al.*, 2021). Entre muitas substâncias antrópicas, os resíduos farmacêuticos são um exemplo claro dessa contaminação humana (Wood *et al.*, 2015; Ben *et al.*, 2020; Wilkinson *et al.*, 2022). Considerando o crescente uso de drogas em todo o mundo e a possibilidade de várias classes de drogas não serem totalmente metabolizadas (Geboers *et al.*, 2015; Moss *et al.*, 2017) e excretadas através das fezes ou urina, atingindo o meio aquático, aumentando a presença desses resíduos no meio ambiente (Mahmood *et al.*, 2019).

A presença de resíduos farmacêuticos, industriais, têxteis e de mineração, entre muitos outros, no meio aquático, reforça a necessidade de desenvolver métodos aprimorados para detectar e avaliar os efeitos ecotoxicológicos das substâncias no meio aquático. Dentre eles, destaca-se a presença global de resíduos farmacêuticos, com maior concentração em países de baixa e média renda. A presença de fármacos e seus produtos de transformação no meio ambiente foi detectada em 71 países, com 631 substâncias farmacêuticas encontradas (Beek *et al.*, 2016). Além disso, muitas das concentrações detectadas em todo o mundo foram superiores às concentrações consideradas seguras para organismos aquáticos, ou que são preocupantes em termos de seleção para resistência antimicrobiana, representando uma ameaça global à saúde humana e ambiental (Wilkinson *et al.*, 2022).

Destaca-se que apenas a detecção de resíduos no meio ambiente não significa necessariamente que eles sejam biodisponíveis, nem que venham a ter efeitos nocivos aos

sistemas. Assim, o uso de modelos biológicos em estudos ecotoxicológicos contribui diretamente para avaliar o risco da presença desses resíduos no ambiente aquático, uma vez que apenas o monitoramento químico é pouco informativo com relação aos efeitos ecotoxicológicos (Brack *et al.*, 2019).

No geral, os testes ecotoxicológicos são eficientes, rápidos e de baixo custo, sendo considerados uma importante ferramenta para avaliar os efeitos nocivos das contaminações humanas sobre o meio ambiente aquático. Esses testes podem ser definidos como um sistema de testes que expõem um organismo ou célula a uma determinada substância e, posteriormente, avaliam efeitos biológicos em diferentes níveis de organização (Schuijt *et al.*, 2021). Assim, o uso de bioensaios para avaliar a qualidade da água é essencial para obter uma estimativa dos efeitos de resíduos no ambiente aquático que podem representar risco à vida (Wilkinson *et al.*, 2022).

Uma das vantagens desses testes é a capacidade de simular condições controladas em laboratório, contribuindo para a precisão, análise e interpretação dos resultados (Campana e Wlodkowic, 2018; Altenburger *et al.*, 2019). Provavelmente, devido à crescente preocupação com o monitoramento ecotoxicológico, a implementação de novos modelos biológicos para estudos ecotoxicológicos, como o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata*, vem se destacando e contribuindo diretamente para a aproximação da simulação laboratorial ao meio ambiente.

Classificado como um macro invertebrado bentônico, *Biomphalaria glabrata* possui um padrão de migração limitado no ecossistema, sendo adequado para avaliação de impactos ecotoxicológicos específicos na região tropical. As fases iniciais do ciclo de vida respondem rapidamente ao estresse e as fases adultas são mais resistentes, fornecendo informações importantes para interpretar os efeitos acumulativos dos poluentes, tornando-os bons indicadores das condições do ecossistema local (Barbour *et al.*, 1999; Tallarico *et al.*, 2016).

Biomphalaria glabrata é uma espécie de molusco herbívoro de água doce pertencente à família Planorbidae. Quando adulto, geralmente apresenta uma concha com diâmetro máximo de 40 mm e 11 mm de largura, enrolada em espiral para a esquerda. Em 2001, a Sociedade Americana de Parasitologistas apresentou uma proposta de sequenciamento de seu genoma, mas somente em 2017 seu genoma foi de fato caracterizado (Adema *et al.*, 2017). Essa caracterização forneceu informações

importantes sobre a biologia do molusco de água doce e nos permitiu entender melhor seu sistema imunológico (Castillo *et al.*, 2020). *Biomphalaria glabrata* tem sido detectado em várias regiões da Américas do Norte, Central e do Sul, com destaque o Brasil, onde tem alta prevalência em todo o território, também está presente na África e em alguns países da Ásia (GBIF.org, 2022).

Este molusco de água doce tem uma resposta de defesa inata semelhante como a dos vertebrados, sendo capaz de reconhecer e destruir diferentes patógenos (Abaza *et al.*, 2016). O crescente conhecimento científico tanto do organismo como de seus sistemas, torna este molusco alvo de diversas pesquisas de ecotoxicidade (Lima *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021; Caixeta *et al.*, 2021). Seu sistema de defesa interno é composto, principalmente, por células internas de defesa (hemócitos) e fatores solúveis na hemolinfa (Monte *et al.*, 2019). Vasquez e Sullivan (2001) apresentaram a importância da hemolinfa no processo imunológico do molusco, sugerindo que elementos solúveis de sua hemolinfa, como as lectinas, desempenham um papel direto no mecanismo de reconhecimento e combate imunológico (Vasquez e Sullivan, 2001).

Os hemócitos, células produzidas nos tecidos hematopoiéticos dos moluscos, são encontrados na hemolinfa do molusco e sua principal função é a defesa interna (Abaza *et al.*, 2016). Sua morfologia e conteúdo enzimático são variáveis, sendo classificados em dois tipos: hialinócitos e granulócitos (Cavalcanti *et al.*, 2012). Considerando o vasto conhecimento sobre o sistema imunológico e seu desenvolvimento embrionário, os moluscos têm sido utilizados como modelos biológicos para avaliar a ecotoxicidade de diversas substâncias, incluindo poluentes emergentes, apresentando grande potencial (Caixeta *et al.*, 2020; Caixeta *et al.*, 2022).

Dentre as inúmeras características que favorecem o uso de *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico, destaca-se a sensibilidade às mudanças ambientais, permitindo a avaliação de respostas celulares, teciduais e comportamentais, diferentemente de outros modelos biológicos como cianobactérias, microalgas e alguns microcrustáceos. Este é um dos poucos modelos biológicos que permite o estudo ecotoxicológico de resíduos insolúveis em água, pois por meio de sua característica de raspagem, absorve substâncias presentes no fundo da água (Pena *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Caixeta *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2019). Considerando o potencial do molusco como modelo biológico, o objetivo com este estudo foi apresentar os principais testes

realizados utilizando *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para avaliações ecotoxicológicas.

MÉTODOS

Estratégia de busca

Foi realizada revisão sistemática da literatura nas bases de dados *ScienceDirect*, PubMed e SciELO. As palavras-chave "*Biomphalaria glabrata*", "ecotoxicologia", "toxicidade", "genotoxicidade", "embriotoxicidade" e "citotoxicidade" foram combinadas e utilizadas para busca de publicações de interesse nas bases de dados publicadas até junho de 2022, no idioma inglês e português. A revisão sistemática seguiu as diretrizes recomendado pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (Moher *et al.*, 2009).

Crítérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão dos artigos foram: (i) utilizar *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico; (ii) apresentar dados sobre possíveis efeitos ecotoxicológicos (toxicidade, embriotoxicidade, citotoxicidade ou genotoxicidade); (iii) estudos realizados *in vivo* ou *in vitro*; (iii) ter pelo menos um grupo controle negativo; e (iv) idioma inglês ou português. Os critérios de exclusão foram: (i) artigos de revisão científica; (ii) resumos em eventos científicos; (iii) relatórios técnicos; (iv) estudos parasitológicos; (v) outra espécie de molusco; e (vi) duplicatas. Quaisquer discrepâncias entre as decisões, sejam de inclusão ou exclusão de artigos, foram resolvidas por consenso entre os revisores. O software *Rayyan* foi utilizado para auxiliar no processo de triagem dos artigos (Ouzzani *et al.*, 2016).

Extração de dados

Antes da extração dos dados, uma lista de informações a serem extraídas de cada trabalho incluído nesta revisão foi determinada entre os autores. As informações extraídas de cada estudo foram, resumidamente: (i) ano de publicação; (ii) principais ensaios; (iii) amostra analisada; (iv) tamanho da amostra; (v) matriz analisada; (vi) concentrações da

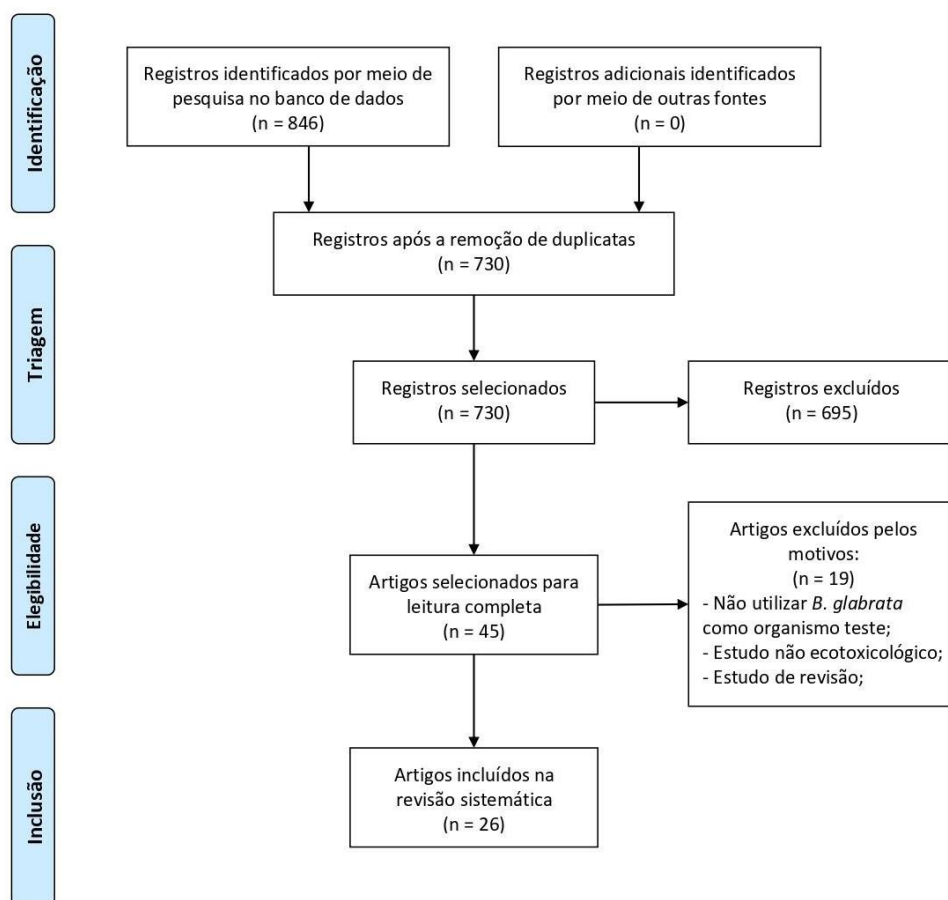
matriz; (vii) tempo de exposição; (viii) mortalidade; (ix) concentração letal; (x) principais resultados; e (xi) tipo de estudo (*in vivo* e/ou *in vitro*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Triagem dos artigos

Oitocentos e quarenta e seis estudos foram encontrados na primeira etapa de triagem e 730 estudos permaneceram após a exclusão de duplicatas. Em seguida, todos os títulos e resumos foram lidos para encontrar estudos ecotoxicológicos utilizando *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico. Após essa segunda etapa, restaram 45 estudos para leitura do texto na íntegra. Para serem incluídos nesta revisão, todos os requisitos de inclusão apresentados deveriam ser cumpridos. Por fim, 26 estudos publicados entre os anos de 1973 e 2022 (Lima *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Douglas e Sullivan, 1992; Mona *et al.* al., 2013; Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021; Sullivan *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2018; Salice e Roesijadi, 2002; Ansaldo *et al.*, 2009; de Albuquerque *et al.* ., 2014; Garcia *et al.*, 2021; Tallarico *et al.*, 2014; Nakano *et al.*, 2003; Caixeta *et al.*, 2021; Cheng e Sullivan, 1973; Cheng e Sullivan, 1977; Gustafson *et al.*, 2015 ; Kaur *et al.*, 2016; Münzinger e Guarducci, 1988; Rivero-Wendt *et al.*, 2014; Sullivan e Cheng, 1976; Pena *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022) foram elegíveis para esta revisão sistemática (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma (PRISMA) de cada etapa do processo de triagem de artigos nas bases de dados *ScienceDirect*, PubMed e SciELO.



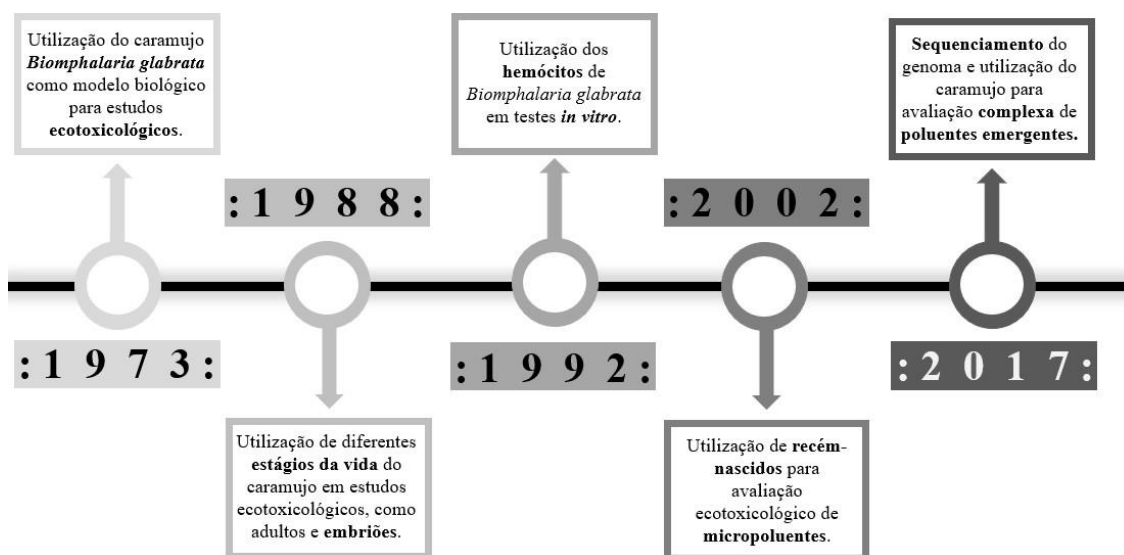
Fonte: MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Med.** v. 6, n. 7, p. e1000097, 2009. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed1000097>

Progressos da utilização do molusco em estudos ecotoxicológicos

Biomphalaria glabrata tem sido usado como modelo biológico desde 1973 (Figura 3), onde foi usado para avaliar os efeitos ecotoxicológicos de substâncias químicas em diferentes concentrações (Cheng e Sullivan, 1973). Neste trabalho foi demonstrado que o sulfato de cobre foi capaz de aumentar a frequência cardíaca do molusco mesmo em baixas concentrações (2,5 mg/L). No entanto, apenas concentrações de 875 mg/L e 2500 mg/L foram letais para 50% e 100% dos moluscos, respectivamente

(Cheng e Sullivan, 1976). Além disso, foi possível observar que o sulfato de cobre causa redução na osmolaridade da hemolinfa (Cheng e Sullivan, 1977).

Figura 3. Linha do tempo de um breve histórico do uso de *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico.



Fonte: Autores.

Em 1988, *Biomphalaria glabrata* foi utilizada para avaliar a ecotoxicidade de uma substância química (cloreto de zinco) em diferentes fases da vida do molusco, tanto adulto quanto embrionário (Münzinger e Guarducci, 1988). Em 1992, foi realizado um estudo *in vitro* com hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. Neste estudo, as células internas de defesa do molusco foram expostas por 15 minutos ao cloreto de amônio e a taxa de fagocitose foi avaliada em diferentes concentrações do composto (Douglas e Sullivan, 1992).

Em 2002, diferentes cepas de *Biomphalaria glabrata* foram utilizadas para avaliar a ecotoxicidade do cádmio em diferentes fases da vida do molusco, como embrião, recém-nascidos e adultos (Salice e Roesijadi, 2002). A partir de 2005, diferentes sistemas de moluscos (nervoso, reprodutivo e imunológico) passaram a ser utilizados para avaliações ecotoxicológicas (Sullivan *et al.*, 2005; Mona *et al.*, 2013), porém, somente nos últimos anos, após o sequenciamento de seu genoma (Adema *et al.*, 2017), foi observado um número crescente de estudos de ecotoxicidade utilizando-o como modelo biológico.

Em geral, esses estudos avaliam potenciais poluentes emergentes no meio ambiente, como nanomateriais (Caixeta *et al.*, 2021; Oliveira-Filho *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2019), lodo de esgoto doméstico e industrial (Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021), herbicidas (Lima *et al.*, 2018), corante têxtil (Garcia *et al.*, 2021) e produtos farmacêuticos (Baynes *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2019). Além disso, uma grande variedade de possibilidades de ensaios citotóxicos, genotóxicos, embriotóxicos vem sendo desenvolvida, mas sem uma padronização entre eles. As principais vantagens e desvantagens do uso de *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico em estudos ecotoxicológicos.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilidade a mudanças no meio; - Alta taxa de reprodução; - Tamanho pequeno; - Baixo custo de manutenção; - Desenvolvimento embrionário rápido; - Desenvolve resposta com substâncias solúveis e insolúveis em água; - Possui biologia bem descrita; - Realização de ensaios <i>in vitro</i>; - Sua sequência genômica é descrita. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não possui métodos padronizados; - Falta de substâncias padrão; - Carência de controles positivos; - Comportamento de fuga para fora d'água em condições desfavoráveis; - Poucos estudos de ecotoxicidade;

Artigos incluídos

Na tabela 2 estão apresentados os estudos selecionados para compor esta revisão sistemática com os principais resultados obtidos após a exposição de *Biomphalaria glabrata* a diferentes substâncias. Os principais biomarcadores amostrados utilizados nos estudos incluídos foram: (i) moluscos (toxicidade e bioacumulação), (ii) embriões (embriotoxicidade) e (iii) hemócitos ou outras células (citotoxicidade). Nos estudos, a toxicidade foi avaliada por meio da exposição a diferentes concentrações da substância exógena (poluente), por um período, tendo como desfecho principal a mortalidade. A

classificação de bioacumulação de um estudo pode ser definida como a verificação do aumento da concentração de uma substância, presente no ambiente, nos tecidos do molusco por meio de sua absorção. Os testes de embriotoxicidade foram classificados como testes a serem utilizados em embriões para avaliar a exposição no desenvolvimento embrionário, após uma substância específica. Por fim, os ensaios de citotoxicidade são aqueles que avaliaram o impacto da exposição de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* ou outros tecidos a uma substância química específica, observando principalmente alterações morfológicas e funcionais nas células.

Tabela 2. Estudos selecionados utilizando *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico potencial para estudos de ecotoxicidade.

Referência	Ensaio	Local de estudo	Amostra teste	Matrix teste	Concentração (mg/L)	Tempo de exposição (dias)
Pena <i>et al.</i>, 2022	EMB	Brasil	Embrião	LA-IONPs e cloreto de ferro	1,0; 2,5; 6,25; 10,93; 15,65; 39,0 e 97,65	1, 2, 3, 4, 5 e 6
	TOX	Brasil	Recém-nascidos	LA-IONPs e cloreto de ferro	1,0; 2,5; 6,25; 10,93; 15,65; 39,0 e 97,65	4
Wang <i>et al.</i>, 2022	BIO	Reino Unido	Molusco	Microesferas de polietileno	50,0	2 e 21
Siqueira <i>et al.</i>, 2021	EMB	Brasil	Embrião	Lodo doméstico	50; 100; 150 e 500	1, 2 e 8
	TOX	Brasil	Molusco	Lodo doméstico	50; 100; 150 e 500	2 e 15
	CIT	Brasil	Hemócitos	Lodo doméstico	50; 100; 150 e 500	2 e 15
García <i>et al.</i>, 2021	TOX	Brasil	Molusco	Corante ReactiveRed 239	5,64 – 564;0	1
	EMB	Brasil	Embrião	Corante ReactiveRed 239	5,64 – 564;0	1
Caixeta <i>et al.</i>, 2021	TOX	Brasil	Molusco	GLA-IONPs e cloreto de ferro	1,0; 2,5; 6,2 e 15,6	28
	EMB	Brasil	Embrião	GLA-IONPs e cloreto de ferro	1,0; 2,5; 6,2 e 15,6	28

	BIO	Brasil	Corpo do molusco	GLA-IONPs e cloreto de ferro	1,0; 2,5; 6,2 e 15,6	28
Siqueira et al., 2020	EMB	Brasil	Embrião	Lodo industrial	50; 100; 150 e 500	1, 2 e 8
	TOX	Brasil	Molusco	Lodo industrial	50; 100; 150 e 500	2 e 15
	CIT	Brasil	Hemócitos	Lodo industrial	50; 100; 150 e 500	2 e 15
	EMB	Brasil	Embrião	CdTe Quantum Dots	0,0003; 0,0006; 0,0012; 0,0024 e 0,0048	1
Lima et al., 2019	TOC	Brasil	Molusco	CdTe Quantum Dots	0,012; 0,024; 0,048 e 0,096	1
	BIO	Brasil	Hepatopâncreas	CdTe Quantum Dots	0;048	1
	TOX	Brasil	Molusco	AgNPs	0,0; 1,0; 2,5 e 5,0	4
Oliveira-Filho et al., 2019	BIO	Brasil	Corpo do molusco	AgNPs	0,0; 1,0; 2,5 e 5,0	28
	EMB	Brasil	Embrião	AgNPs	0,0; 1,0; 2,5 e 5,0	28
	TOX	Brasil	Hemócitos	Oxifluorfenol	0,125; 0,25 e 0,5	2 e 15
Lima et al., 2018	TOX	Brasil	Hemócitos	Oxifluorfenol	0,125; 0,25 e 0,5	2 e 15
Santos et al., 2018	EMB	Brasil	Embrião	Ácido úsnico	0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 1,5; 2; 2,5; 5 e 10	1
	TOX	Brasil	Molusco	γ -Fe ₂ O ₃ NPs	1; 10 e 100	28

Oliveira-Filho <i>et al.</i>, 2016	EMB	Brasil	Embrião	γ -Fe ₂ O ₃ NPs	1; 10 e 100	10
Kaur <i>et al.</i>, 2016	TOX	Reino Unido	Molusco	MT e DHT	0,0000625; 0,000125; 0,000250 e 0,000500	30
	EMB	Reino Unido	Embrião	MT e DHT	0,0000625; 0,000125; 0,000250 e 0,000500	NI
	CIT	Reino Unido	Glândula albúmen	MT e DHT	0,0000625; 0,000125; 0,000250 e 0,000500	30
	CIT	Reino Unido	Ovotestis	MT e DHT	0,0000625; 0,000125; 0,000250 e 0,000500	30
Gustafson <i>et al.</i>, 2015	TOX	Estados Unidos	Molusco	Atrazina	1	1
		Estados Unidos	Molusco	Atrazina	0;003; 0;3 e 0;03	28
Tallarico <i>et al.</i>, 2014	TOX	Brasil	Molusco	Dicromato de potássio	25; 50; 75; 100; 150 e 200	1
	EMB	Brasil	Embrião	Dicromato de potássio	1,30; 3,13; 6,25; 12,50; 25 e 50	1
de Albuquerque <i>et al.</i>, 2014	EMB	Brasil	Embrião	Composto de <i>Microgramma vacciniifolia</i>	1; 10 e 100	1

	TOX	Brasil	Molusco	Composto de <i>Microgramma vacciniifolia</i>	1; 10 e 100	1
Rivero-Wendt et al., 2014	EMB	Brasil	Embrião	MT	0,01; 0,1 e 1,0	28
	CIT	Brasil	Células germinativas	MT	0,01; 0,1 e 1,0	28
Mona et al., 2013	TOX	Egito	Molusco	Glifosato	0,5 e 5	21
	CIT	Egito	Corpo do molusco	Glifosato	0,5 e 5	21
	TOX	Egito	Molusco	Atrazina	5 e 10	21
	CIT	Egito	Corpo do molusco	Atrazina	5 e 10	21
Ansaldo et al., 2009	EMB	Argentina	Embrião	Cádmium	0,1 e 0,05	4
	EMB	Argentina	Embrião	Chumbo	0,5; 0,1 e 0,05	4
	EMB	Argentina	Embrião	Arsênio	0,5; 0,1 e 0,05	4
Sullivan et al., 2005	CIT	Estados Unidos	Glândula produtora de amebócitos	Colchicina	1,0	0.04, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1 e 3
	CIT	Estados Unidos	Hemócitos	Colchicina	1,0	0.04, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1 e 3
	TOX	Estados Unidos	Molusco	Colchicina	1,0	1, 2 e 3
	CIT	Estados Unidos	Tecido nervoso	Colchicina	1,0	3
Nakano et al., 2003	EMB	Brasil	Embrião	Ciclofosfamida	9,4; 94 e 940	10
Salice and Roesijadi, 2002	TOX	Estados Unidos	Molusco jovem (BS90 e NMRI)	Cádmium	0,000013; 0,000027; 0,000055 e 0,00011	14

	TOX	Estados Unidos	Molusco	Cádmium	0,000027; 0,000055; 0,00011 e 0,00022	14
	EMB	Estados Unidos	Embrião (BS90 e NMRI)	Cádmium	0,0000055; 0,00001; 0,000016; 0,000022; 0,000027 e 0,000032	14
Douglas and Sullivan, 1992*	CIT	Estados Unidos	Hemócitos	Cloreto de amônia	0,000005; 0,00005; 0,00005; 0,0025; 0,005; 0,01	0.01
Münzinger and Guarducci, 1988	TOX	Itália	Molusco	Cloreto de Zinco	0,5; 1,5; 3,0 e 5,0	30
	EMN	Itália	Embrião	Cloreto de Zinco	0,5; 1,0 e 2,0	7
Cheng and Sullivan, 1977	TOX	Estados Unidos	Molusco	Sulfato de cobre	0,06	1 e 2
Sullivan and Cheng, 1976	TOX	Estados Unidos	Molusco	Sulfato de cobre	100; 500; 750; 875; 1000 e 2500	1
Cheng and Sullivan, 1973	TOX	Estados Unidos	Molusco	Sulfato de cobre	0,01; 0,05; 0,10; 1,0; 2,5; 5,0; 12,5 e 20,0	0.8

Legenda: MT - 17 α -metiltestosterona; DHT - e 5 α -di-hidrotestosterona; NPs γ -Fe₂O₃ – Maghemita; AgNPs- nanopartículas de prata; GLA-IONPs - nanopartículas de óxido de ferro em bicamada de ácido glucônico; LA-IONPs - nanopartículas de óxido de ferro em bicamada de ácido láurico; EMB – embriotoxicidade; TOX – toxicidade; BIO – bioacumulação, CIT – citotoxicidade; * - ensaio *in vitro*; NI - não informado.

Local do estudo

Estudos utilizando o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos foram realizados em seis países. Dentre eles, o Brasil (n = 14; 53,8%) que se destaca com o maior percentual de estudos, seguido pelos Estados Unidos (n = 7; 26,9%), Reino Unido (n = 2; 7,6%), Egito, Itália e Argentina (n = 1; 3,8%, cada). O elevado número de estudos realizados no Brasil pode ser explicado pela alta distribuição de *Biomphalaria glabrata* em todo o país. Diferentemente, *Lymnaea stagnalis* é amplamente distribuído em zonas temperadas e requer temperaturas mais baixas para o desenvolvimento de testes ecotoxicológicos, enquanto *Biomphalaria glabrata* é amplamente distribuído em zonas tropicais e subtropicais e não requer temperaturas mais baixas em testes ecotoxicológicos, demonstrando com maior fidelidade os possíveis impactos a presença de contaminantes aquáticos nos ecossistemas locais. Além disso, possui diversos biomarcadores (embriões, tecidos, células, enzimas e DNA) que permitem monitorar a qualidade dos cursos d'água afetados pela presença de poluentes (Barbosa e Barbosa, 1994; Southerland e Stribling 1995). Esse molusco em específico tem grande relevância para a saúde pública, pois é um hospedeiro intermediário do parasita causador da esquistossomose e, conseqüentemente, tem sido desenvolvido um número considerável de estudos com o objetivo de desenvolver novos moluscicidas, bem como seu uso como modelo biológico em ecotoxicologia.

Tamanho do molusco

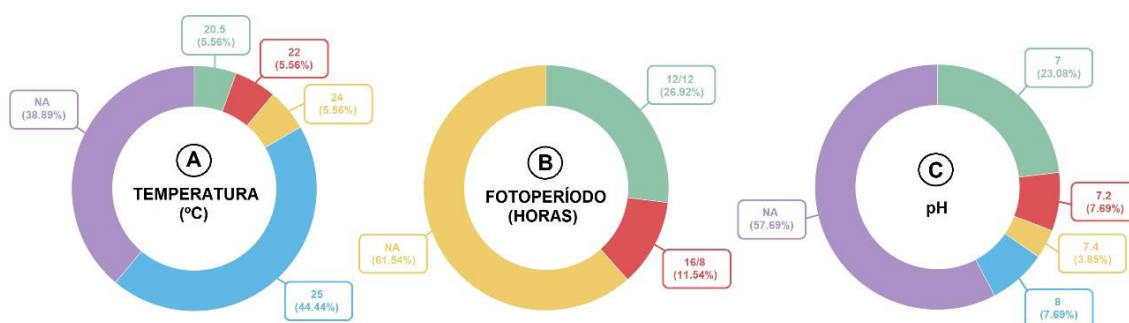
O tamanho médio dos moluscos utilizados nos estudos incluídos foi de 12 ± 2 mm. A seleção do tamanho do molusco deve ser exclusiva de *Biomphalaria glabrata*. Essa exclusividade deve ser considerada no momento do experimento, pois o tamanho adulto difere entre o modelo padronizado de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (OECD, 2016) e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Por esta razão, o uso de caracóis de 12 ± 2 mm é recomendado para estudos ecotoxicológicos.

Manutenção e criação

Biomphalaria glabrata são geralmente mantidos e criados em aquários de plástico com um volume de 100 mililitros por molusco. A temperatura de criação desse molusco

de água doce variou de 20°C a 30°C, e a maioria dos estudos registrou uma temperatura média da água de 25°C (n = 12; 46,1%). O fotoperíodo foi pouco informado, apenas 38,5% dos estudos relataram, sendo que sete utilizaram o fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro) e três 16/8 horas (claro/escuro). Na maioria dos estudos, a água usada para criar caracóis era filtrada, com pH 7 e sem cloro. No entanto, algumas variações na manutenção dos caracóis puderam ser observadas, como a variação do pH da água, atingindo valores de até 8,0, e o tipo de água, como água filtrada sem cloro (n = 14; 77,8 %), purificada com solução salina Nolan-Carrick (n = 3; 11,5%) e natural (n = 1; 3,8%). Além disso, vários estudos não apresentaram informações específicas sobre a manutenção e criação de moluscos como temperatura (n = 10), fotoperíodo (n = 16) e pH (n = 15) (Figura 4).

Figura 4. Características de manutenção e criação do molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* adotadas pelos estudos de ecotoxicidade incluídos nesta revisão.



Legenda: A) Temperatura; B) Fotoperíodo; C) Tipo de água; NA = não apresentado.

Fonte: Autores.

Alguns parâmetros relacionados à qualidade da água podem ser analisados durante a manutenção e criação de moluscos. Esses parâmetros são dureza, alcalinidade, saturação de oxigênio, condutividade, amônia, nitrato, nitrito e oxigênio dissolvido na água. O monitoramento desses parâmetros, em especial a dureza total e de cálcio da água, deve ser realizado para garantir bons resultados durante os testes de ecotoxicidade. A dureza da água está diretamente relacionada à capacidade de reprodução dos caracóis e seu desenvolvimento no aquário. Além disso, águas com altos valores de dureza podem causar redução na toxicidade de algumas substâncias de teste, como metais (Oliveira-Filho *et al.*, 2014), reforçando a necessidade de se realizar o monitoramento antes, durante e depois do experimento.

A folha de alface (*Lactuca sativa*) é o principal alimento utilizado na manutenção da *Biomphalaria glabrata*. No entanto, algumas divergências relacionadas à alimentação dos moluscos foram encontradas, como frequência de alimentação, suplementação alimentar e quantidade de alimento disponível. Alguns estudos fornecem alimentação diária sem privação (n = 7; 26,9%), enquanto outros apresentam algumas restrições alimentares como: 1 cm² de alface por molusco por dia (n = 3; 11,5%), alimentação em dias alternados (n = 2; 7,7%), a cada dois dias (n = 1; 3,8%) ou três vezes por semana (n = 1; 3,8%). Em alguns casos, ração para peixes (TetraMin) foi utilizada como suplemento alimentar (n = 4; 15,4%) ou como alimento principal (n = 2; 7,7%).

Tipos de poluentes avaliados

Foram avaliados 11 tipos de poluentes nos estudos selecionados nesta revisão. O tipo de poluente mais frequente nos estudos foram as nanopartículas metálicas (n = 5; 19,2%) (Pena *et al.*, 2022; Caixeta *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2016), seguido de compostos químicos (n = 4; 15,4%) (Cheng e Sullivan, 1973; Sullivan e Cheng, 1976; Cheng e Sullivan, 1977; Douglas e Sullivan 1992), resíduos farmacêuticos (n = 4; 15,4%) (Nakano *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2016; Rivero-Wendt *et al.*, 2014), herbicidas (n = 3; 11,5%) (Gustafson *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018; Mona *et al.*, 2013), metais pesados (n = 3; 11,5%) (Münzinger e Guarducci 1988; Salice e Roesijadi, 2002; Ansaldo *et al.*, 2009), lodo doméstico ou industrial (n = 1; 3,8%, cada) (Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021), tingimento têxtil (n = 1; 3,8%) (Garcia *et al.*, 2021), microesferas de plástico (n = 1; 3,8%) (Wang *et al.*, 2022), compostos derivados de plantas (n = 1; 3,8%) (de Albuquerque *et al.*, 2014), amostras de água de afluentes e efluentes (n = 1; 3,8%) (Tallarico *et al.*, 2014) e compostos derivados de líquen (n = 1; 3,8%) (Santos *et al.*, 2018).

Desenho experimental

Os dados revisados mostraram falta de padronização no desenho experimental e nos protocolos de utilização do molusco *Biomphalaria glabrata* em ensaios ecotoxicológicos. Os principais pontos que evidenciaram a falta de padronização foram:

(i) tempo de exposição; (ii) número de réplicas; (iii) tamanho da amostra; e (iv) número de concentrações.

Tempo de exposição

O tempo de exposição é um fator que, em muitos trabalhos, se divide em dois segmentos, exposição aguda e crônica. A toxicidade aguda deriva da exposição de curto prazo de indivíduos a uma substância em um curto período, dentro de 24 - 96 horas. A toxicidade crônica é fundamental para complementar o teste de toxicidade aguda e obter informações adequadas sobre os agentes estudados. Em geral, os testes de toxicidade crônica são realizados por sete a 21 dias (Souza *et al.*, 2022). Um total de 20 (76,9%) estudos avaliaram a toxicidade de determinada substância sobre a *Biomphalaria glabrata*. Entre eles, dez (50%) estudos avaliaram apenas a toxicidade aguda, seis (30%) apenas a toxicidade crônica e quatro (20%) ambas as toxicidades, no molusco. Os resultados mostraram que o tempo de exposição utilizado para avaliar a toxicidade aguda foi, principalmente, de 24 horas (n = 8; 57,1%), seguido de 48 horas (n = 5; 35,7%), 96 horas (n = 3; 21,4%) e 72 horas (n = 1; 7,1%, cada). Na exposição crônica, 28 dias foram usados com maior frequência (n = 4; 36,3%), seguidos de 15 dias (n = 3; 27,3%), 30 dias (n = 2; 18,2%), 14 e 21 dias (n = 1; 9,1%, cada).

Os principais fatores que influenciaram diretamente no tempo de exposição dos estudos, sejam agudos ou crônicos, foram as concentrações utilizadas e as propriedades da substância-teste. Na maioria dos estudos que avaliaram a toxicidade aguda, a exposição dos moluscos por 24 horas foi suficiente para observar alterações, como alterações comportamentais, mortalidade e infertilidade. Na exposição crônica, a utilização de um período de exposição de 28 dias, pode ser explicada por meio da diretriz da OCDE nº 243, elaborada com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição prolongada a produtos químicos na reprodução e sobrevivência do molusco de água doce *Lymnaea stagnalis*, por 28 dias (OCDE, 2016). Além disso, ao extrair os dados dos artigos incluídos, observou-se que todos os estudos que avaliaram a toxicidade crônica após 28 dias de exposição também realizaram testes de embriotoxicidade, corroborando a hipótese.

Um total de 17 (65,4%) estudos realizaram ensaios para avaliações embriotoxicológicas. Em relação ao tempo de exposição do embrião, os resultados

mostraram que o tempo de exposição principal foi de 24 horas (n = 8; 47,1%), seguido de >192 horas (n = 7; 41,2%), 48 e 96 horas (n = 3; 17,6%, cada), 192 horas (n = 2; 11,8%), 72, 120, 144 e 168 (n = 1; 5,9%, cada). Apenas um artigo (1/17) não relatou o tempo de exposição utilizado para o teste (Kaur *et al.*, 2016). *Biomphalaria glabrata* tem uma duração média de seu período embrionário de oito dias (Camey e Verdonk 1970; Kawano *et al.* 1992; Kawazoe, 1976; Talarico *et al.*, 2014). Assim, o tempo de exposição do molusco em períodos superiores a 192 horas é suficiente para analisar todas as fases do desenvolvimento embrionário em termos de taxa de eclosão. No entanto, alguns fatores, como a temperatura, podem influenciar no tempo de desenvolvimento (Kawazoe, 1976). Considerando a embriologia descrita na literatura (Camey e Verdonk 1970; Kawano *et al.*, 1992), o estágio embrionário de blástula (15 horas pós-fertilização) é o mais utilizado para estudos de embriotoxicidade com *Biomphalaria glabrata*. Além disso, deve-se considerar que, dependendo do estágio embrionário, há diferença na sensibilidade a um determinado poluente (Garcia *et al.*, 2021).

Entre os 26 estudos incluídos, um total de sete (26,9%) realizaram ensaios de citotoxicidade. Comparado com os ensaios de toxicidade e embriotoxicidade, o ensaio de citotoxicidade apresentou as maiores variações em termos de tempo de exposição dos moluscos à substância-teste. Essa exposição, assim como a toxicidade, pode ser dividida em dois segmentos, exposição aguda e crônica. Dos sete estudos, um (14,3%) realizou apenas exposição aguda a moluscos, três (42,9%) apenas exposição crônica e dois (28,6%) realizaram ambas as exposições. Para a exposição aguda, o tempo de exposição mais utilizado foi de 48 horas (28,6%), enquanto a exposição crônica foi de 15 dias (28,6%). Entre os estudos, apenas um (14,3%) (Douglas e Sullivan, 1992) realizou o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, utilizando um tempo de exposição de 15 minutos.

Réplicas

As réplicas entre os estudos selecionados foram bastante heterogêneas. Nos estudos com testes de toxicidade (aguda ou crônica) a média de réplicas foi de 2,3, com maior prevalência de testes em triplicata (n = 10; 50%), como estudos de embriotoxicidade, com média de 2,2 e maior prevalência de triplicata (n = 7; 41,2%). Quanto aos estudos que realizaram ensaios de citotoxicidade e bioacumulação, apenas

metade apresentou dados sobre o número de réplicas utilizadas (6/12), tendo a soma das réplicas médias um valor de 2,3 por concentração.

Considerando as recomendações da OCDE nº 243 (OCDE, 2016) sobre o número de réplicas por concentração, apenas um estudo (3,8%) utilizaram-se seis réplicas nos experimentos. Este baixo número de estudos expõe a necessidade de desenvolver estudos para padronizar o número de réplicas em ensaios utilizando *Biomphalaria glabrata*, considerando não apenas o número de repetições e concentrações, mas também o número de moluscos utilizados no ensaio. Portanto, com base nos dados dos estudos selecionados, deve-se realizar a utilização de pelo menos três repetições do experimento.

Número de Concentrações

O número de concentrações variou muito nos estudos revisados. Nos estudos de toxicidade, o número de concentrações utilizadas para avaliar os efeitos da substância teste foi de 1 a 2 (n = 5; 22,7%), 3 a 4 (n = 12; 54,5%) e 5 a 8 (n = 4; 18,2%). Para estudos de embriotoxicidade, o número de concentrações utilizadas foi de 1 a 2 (n = 1; 5,3%), 3 a 4 (n = 12; 63,2%), 5 a 8 (n = 4; 21,1%) e 9 (n = 1; 5,3%). Os estudos de citotoxicidade variaram de 1 a 2, 3 a 4 (n = 5; 45,5%, cada) e 6 (n = 1; 9,0%). Por fim, os estudos de bioacumulação utilizaram apenas o número de concentrações de 1 a 2, 3 a 4 (n = 2; 50,0%, cada). Para os ensaios de embriotoxicidade e toxicidade, um estudo (García *et al.*, 2021) descreveu apenas a faixa de concentração utilizada nos experimentos, sem descrever o número de concentrações utilizadas.

Como pode ser visto, um número variável de concentrações foi usado em todas as classificações de teste. Uma prevalência do número de concentrações utilizadas inferior a 5 pode ser observada nos estudos avaliados (n = 19; 73,1%). Este número contraria a recomendação das diretrizes da OCDE. De acordo com a OCDE, o uso de pelo menos cinco concentrações é recomendado para obter uma curva de concentração-resposta, concentração de efeito não observado, concentrações letais e concentração de efeito mais baixa observada (OCDE, 2016). Por outro lado, considerando a recomendação da OMS, em que para as primeiras análises de triagem de toxicidade química, pelo menos três concentrações (10, 100 e 1000 mg/L) devem ser utilizadas, um maior número de estudos (n = 21; 80,8%) atendem a essa recomendação (OMS, 1965).

Interação molusco de água doce e poluentes

A interação dos compostos químicos (poluentes) com o molusco de água doce depende basicamente das propriedades físicas, metabolismo, meio de exposição, tempo de exposição e concentração da substância. Em *Biomphalaria glabrata*, a interação entre objetos estranhos e hemócitos ocorre via padrões de reconhecimento e produção de lectinas (Martins-Sousa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Pila *et al.*, 2016, Humphries e Deneckere, 2018). Após reconhecimento e ativação, os hemócitos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pereira *et al.*, 2006) e mediadores inflamatórios como o BgMIF, uma proteína homóloga ao fator inibidor de migração de macrófagos de mamíferos (MIF) (Garcia *et al.*, 2010). Além disso, outras proteínas funcionalmente homólogas às citocinas de mamíferos TNF- α , IL-1 β e IL-17 já tiveram sua participação descrita no sistema de defesa interno de *Biomphalaria glabrata* (Castillo *et al.*, 2020). Assim, a quantificação da concentração dessas citocinas pode ser um potencial biomarcador a ser explorado e elucidado.

Nos embriões, que possuem membrana gelatinosa composta principalmente por membrana externa, substância coloidal, cápsula ovígera e substância perivitelina (Kawano *et al.*, 2008), a interação com poluentes pode ser influenciada, pois esta membrana constitui uma barreira que reduz a absorção de alguns produtos químicos (Araújo *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2015). No entanto, essa diferença de resposta de acordo com o tipo de poluente estudado ainda é limitada (Caixeta *et al.* 2022). Assim, mais estudos devem ser realizados para elucidar a interação entre o embrião e os diferentes tipos de poluentes.

No geral, este molusco de água doce integra os efeitos das variações ambientais de curto prazo, respondendo rapidamente ao estresse. Além disso, considerando seu ciclo embrionário de oito dias (Tallarico *et al.*, 2014), pode ser facilmente monitorado e analisado ao longo do período, quando comparado a outros organismos como o peixe-zebra (*Danio rerio*) que possuem um ciclo embrionário de 35 dias (Adrian *et al.*, 2005).

Biomarcadores

Ensaio de toxicidade

Dentre os testes de toxicidade, é possível avaliar alguns parâmetros relacionados ao molusco de água doce após a exposição, como mortalidade e respostas comportamentais anormais (Cheng e Sullivan, 1973, Tallarico *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2019). Parâmetros como mortalidade foram avaliados durante a exposição a *Biomphalaria glabrata*, muitas vezes com o objetivo de determinar a concentração letal para 50% dos organismos (CL50) (Sullivan e Cheng, 1976; Münzinger e Guarducci 1988; Sullivan *et al.*, 2005; Tallarico *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021; Caixeta *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022). As principais características que foram consideradas para a classificação dos moluscos mortos são: (i) perda de hemolinfa; (ii) despigmentação da casca; (iii) imobilidade; e (iv) falta de batimentos cardíacos. Além disso, diferente de outros modelos utilizados para estudos ecotoxicológicos, como cianobactérias, *Daphnia sp.* e *Artemia sp.*, o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* permite uma maior facilidade de avaliação da recuperação após a exposição, pois podem ser facilmente lavados com água filtrada e sem cloro para remover vestígios da substância exposta (Tallarico *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019).

Além de avaliar a mortalidade dos moluscos, existe a possibilidade de realizar análises comportamentais com este organismo. Esta análise baseia-se na observação de alterações comportamentais causadas pela exposição a uma determinada substância, como frequência de ir à superfície e sair da água, distribuição pelo aquário (Pieri e Jurberg, 1981), reclusão na concha, letargia e evasão de água (Caixeta *et al.*, 2021). Além disso, a existência do albino *Biomphalaria glabrata* facilitou a análise da frequência cardíaca durante e após a exposição. Esta característica é vantajosa para avaliar os batimentos cardíacos, pois a concha deste molusco é quase transparente, e o coração pode ser visto por meio da concha ao microscópio (Cheng e Sullivan, 1973).

Ensaio de embriotoxicidade

O ensaio de embrião de *Biomphalaria glabrata* foi proposto há cerca de 60 anos para avaliar a toxicidade do pesticida pentaclorofenol (Olivier *et al.*, 1962). No entanto,

somente após a década de 1970, quando os estágios embrionários do molusco foram descritos detalhadamente (Camey e Verdonk, 1970), um maior número de estudos de embriotoxicidade pôde ser observado (Caixeta *et al.*, 2022). O molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* tem um período embrionário médio de oito dias (Camey e Verdonk 1970; Kawano *et al.* 1992; Kawazoe, 1976; Tallarico *et al.*, 2014). Para estudos ecotoxicológicos, este parâmetro é comumente utilizado para avaliar o desenvolvimento embrionário do molusco nos estágios de blástula (0-15 horas após a primeira clivagem), gástrula (24 - 39 horas), trocóforo (48 - 87 horas) e véliger (96 - 111 horas) (Camey e Verdonk, 1970).

Considerando que a maioria dos estudos utilizou as diretrizes da OCDE n° 243, muitos autores iniciarão a exposição no estágio de blástula < 15 horas após a fertilização (de Albuquerque *et al.*, 2014; Tallarico *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Siqueira *et al.*, 2020; Garcia *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022). Durante o período de exposição do embrião, múltiplas respostas podem ser analisadas, como mortalidade (Salice e Roesijadi, 2002; de Albuquerque *et al.*, 2014; Tallarico *et al.*, 2014; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Caixeta *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022), tempo de desenvolvimento (de Albuquerque *et al.*, 2014; Tallarico *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022), alterações morfológicas (Münzinger e Guarducci 1988; Salice e Roesijadi, 2002; Nakano *et al.*, 2003; Ansaldo *et al.*, 2009; de Albuquerque *et al.*, 2014; Tallarico *et al.*, 2014; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Caixeta *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022) e taxa de eclosão embrionária (Salice e Roesijadi, 2002; Ansaldo *et al.*, 2009; de Albuquerque *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Caixeta *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022), esses biomarcadores são normalmente analisados desde o estágio de blástula (< 15 h) até a eclosão (168 h).

A taxa de mortalidade é um dos principais parâmetros avaliados em estudos de embriotoxicidade. Vários critérios são usados para classificar os moluscos recém-nascidos mortos, como ausência de batimentos cardíacos, imobilidade e descoloração da concha (Münzinger e Guarducci 1988; Salice e Roesijadi, 2002; Nakano *et al.*, 2003; Ansaldo *et al.*, 2009; Ansaldo *et al.*, 2009; de Albuquerque *et al.*, 2014; Tallarico *et al.*, 2014; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*,

2020; Caixeta *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022). Dentre as diversas causas associadas à mortalidade embrionária, como dano oxidativo e produção de ROS, as alterações morfológicas são as mais exploradas. Essas malformações podem ocorrer de forma hidrópicas, cefálicas, na concha e/ou no pé do molusco. Em uma revisão foram apresentadas as principais causas que levam a essas alterações em moluscos do gênero *Biomphalaria* (Caixeta *et al.*, 2022).

O tempo de desenvolvimento de embriões de *Biomphalaria glabrata* é outro biomarcador utilizado em estudos de ecotoxicidade. Normalmente, o desenvolvimento do embrião é monitorado e avaliado diariamente para observar possíveis alterações. Em alguns estudos, foi possível observar que o teste de substâncias utilizado foi capaz de inibir o desenvolvimento do molusco nas fases iniciais (de Albuquerque *et al.*, 2014; Tallarico *et al.*, 2014; Oliveira-Filho *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Siqueira *et al.*, 2020; Garcia *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022) e desenvolvimento tardio (Salice e Roesijadi, 2002; Tallarico *et al.*, 2014; Caixeta *et al.*, 2021; Pena *et al.*, 2022).

Após um período de 168 horas após a fertilização, os embriões de *Biomphalaria glabrata* começam a eclodir. Este é outro importante biomarcador utilizado em ensaios de embriotoxicidade, pois a inibição da eclosão causada pela exposição do embrião a determinada substância pode induzir sua morte. A redução na taxa de eclosão dos caracóis pode reduzir sua população e, conseqüentemente, agravar os danos ambientais (Kristoff *et al.*, 2011). Essa redução pode ser consequência de atraso no desenvolvimento ou malformação embrionária causada pela exposição à substância teste, como já relatado em vários estudos (Caixeta *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2019; Ansaldo *et al.*, 2009; Münzinger e Guarducci, 1988; Tallarico *et al.*, 2014).

Análises de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade baseia-se na capacidade de uma determinada substância promover alterações metabólicas ou estruturais, resultando ou não em morte celular. Embora não seja um teste muito sensível, o ensaio com corante azul de tripano é um método simples para avaliar a integridade da membrana plasmática. As células mortas que perderam a seletividade da membrana plasmática absorvem o corante e se tornam inviáveis, enquanto as células com membranas intactas não se coram com o corante e permanecem viáveis (Avelar-Freitas *et al.*, 2014). Este ensaio tem sido utilizado em

hemócitos de *Biomphalaria glabrata* com o objetivo de avaliar sua viabilidade, antes e após a exposição a uma determinada substância (Douglas e Sullivan, 1992).

No entanto, este método não permite a diferenciação do tipo de morte celular, como a apoptose. Assim, por meio da coloração de Giemsa, foi possível superar essa limitação, além de permitir a avaliação de alterações celulares, como micronúcleos e binúcleos (Lima *et al.*, 2019). Assim, hemócitos de *Biomphalaria glabrata* têm sido utilizados como biomarcadores em estudos ecotoxicológicos há décadas. No entanto, assim como os demais biomarcadores apresentados neste estudo, há uma falta de padronização deste ensaio.

Alguns autores (Lima *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021) utilizam critérios desenvolvidos para classificar micronúcleos em linfócitos humanos (*HUMAN Micronucleus Project* – HUMN) ou hemócitos de mexilhão (*Mussel MN cytome Project* – MUMNcyt) como método de pontuação para genotoxicidade (Fenech *et al.*, 2003; Bolognesi e Fenech, 2012). No entanto, não há critérios específicos para pontuar alterações celulares, como micronúcleos em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. Considerando a semelhança entre os dois critérios de classificação de micronúcleos em linfócitos humanos e hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, o uso de ambos os critérios não é tecnicamente errado, desde que todos os pontos sejam atendidos integralmente.

Diversas metodologias foram utilizadas para avaliar os efeitos genotóxicos sobre a *Biomphalaria glabrata*. Entre eles, a eletroforese é utilizada para avaliar a toxicidade após exposição aguda e crônica de moluscos a substâncias específicas, como lodo industrial e doméstico, por meio do ensaio cometa alcalino (Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021), para os herbicidas atrazina e glifosato por eletroforese (SDS-PAGE), para avaliar proteínas e isoenzimas, e em conjunto com a reação em cadeia da polimerase (PCR), para avaliar o dano ao RNA e DNA do molusco (Mona *et al.*, 2013).

A concentração de hemócitos circulantes no hemoglifo de *Biomphalaria glabrata* pode ser usada para determinar a citotoxicidade. Este ensaio permite a avaliação quantitativa da população de hemócitos circulantes antes e após a exposição usando um hemocitômetro de Neubauer (Sullivan *et al.*, 2005). No entanto, o tamanho da concha deve ser considerado na contagem, pois está relacionado à idade do molusco e, conseqüentemente, à sua maturidade sexual, o que influencia na concentração de

hemócitos na hemolinfa (Sminia *et al.*, 1974; Borges *et al.*, 2006). Como um macrófago humano, os hemócitos são células que podem realizar a fagocitose envolvendo e destruindo substâncias exógenas, como bactérias.

Com base nessa característica, o ensaio de fagocitose pode avaliar a citotoxicidade de uma determinada substância medindo quantitativa ou qualitativamente a taxa fagocitária do hemócito após a exposição (Douglas e Sullivan, 1992). Além de usar o corante para avaliar os danos nucleares, o ensaio cometa alcalino, descrito por Singh *et al.* (1988) e Grazeffe *et al.* (2008), tem sido utilizado em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* para avaliar esses efeitos genotóxicos após a exposição à substância teste (Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021).

Para interpretação do resultado, existem diferentes abordagens para análise como: (i) medir o comprimento da cauda do cometa em um fotomicrografo ou usando um ralálculo; (ii) classificação de cometas por inspeção visual, tipicamente em cinco categorias; (iii) análise de imagem, com uma câmera de dispositivo acoplado a carga ligada a um computador com software apropriado, disponível comercialmente ou da Internet; e (iv) sistemas automatizados, que buscam cometas e realizam a análise com mínima intervenção humana. (Collins *et al.*, 2008).

No início, para o ensaio cometa, a coloração era realizada com brometo de etídio (Singh *et al.*, 1988; Grazeffe *et al.*, 2008), mas foi adaptada utilizando solução de SYBR safe (Invitrogen) (Siqueira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021). Essa mudança na metodologia de coloração com brometo de etídio para fluorescência (SYBR safe) foi desenvolvida especificamente para reduzir a mutagenicidade, tornando-a mais segura para coloração de DNA em géis de agarose ou acrilamida. Além disso a sensibilidade de detecção é comparável à do brometo de etídio, sendo adequada também para coloração de RNA em géis.

COMPILAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados deste estudo mostram a grande variedade de ensaios possíveis utilizando *Biomphalaria glabrata*, com respostas a substâncias solúveis e insolúveis em água, o que a torna um modelo biológico com potencial para estudos ecotoxicológicos. Esta resposta às substâncias insolúveis decorre do hábito de forrageamento do molusco,

que pode contribuir para a bioacumulação de substâncias precipitadas no fundo do aquário. Por fim, as principais informações sobre *Biomphalaria glabrata*, foram resumidas e apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Resumo dos requisitos para realização de ensaios de ecotoxicidade utilizando o molusco *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico.

Requisitos	Condições do ensaio		
	Toxicidade	Embriotoxicidade	Citotoxicidade
Tempo de ensaio:	7 dias para exposição aguda 35 dias para exposição crônica	7 dias para exposição aguda 15 dias para exposição crônica	7 dias para exposição aguda 35 dias para exposição crônica
Biomarcadores:	Mortalidade Concentração letal Bioacumulação Mudanças comportamentais Respostas anormais	Mortalidade Concentração letal Bioacumulação Malformações Tempo de desenvolvimento Tempo de eclosão	Viabilidade Atividade metabólica Atividade fagocítica Mudanças citológicas Dano ao DNA / RNA
Amostra analisada:	Adultos e recém-nascidos	Embriões	Hemolinfa (hemócitos)
Tempo de exposição:	24 horas para aguda 28 dias para cônica	24 horas para aguda 192 horas para cônica	24 horas para aguda 28 dias para cônica
Forma de exposição:	Aquário	Placas de 12 poços	Aquário (molusco) Tubos de ensaio (hemolinfa)
Material do meio de exposição:	Plástico ou vidro	Plástico ou vidro	Plástico ou vidro
Tempo de observação:	Ao longo da exposição mais 7 dias após exposição.	Ao longo da exposição mais 7 dias após exposição.	Ao longo da exposição.
Meio de exposição:	Água filtrada e sem cloro.	Água filtrada e sem cloro.	Água filtrada e sem cloro.
Volume do meio:	100 mL	10 mL	NA
Temperatura:	25 ± 3 °C	25 ± 3 °C	25 ± 3 °C
pH:	7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2
Fotoperíodo:	12/12 horas (dia/noite)	12/12 horas (dia/noite)	12/12 horas (dia/noite)
Réplicas:	3	3	5

Tamanho amostral por réplica:	10 moluscos	100 embriões	1000 hemócitos
Controle negativo:	Água filtrada e sem cloro.	Água filtrada e sem cloro.	Água filtrada e sem cloro.
Estágio do organismo:	2 meses (molusco adulto) 10 dias (recém-nascido)	0 - 15 horas (blástula) 24 - 39 horas (gástrula) 48 - 87 horas (trocóforo) 96 - 111 horas (estágio de veliger)	2 meses (molusco adulto)
Tamanho:	12 ± 2 mm (molusco adulto)	NA	12 ± 2 mm (molusco adulto)
Aceitação do teste:	Mortalidade do controle < 10%	Mortalidade do controle < 10%	Inviabilidade do controle < 10%

Legenda: NA – não se aplica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos neste estudo, observou-se que *Biomphalaria glabrata* foi viável para a avaliação da ecotoxicidade de diversos tipos de substâncias químicas. Apesar de existir um protocolo padronizado para moluscos *L. stagnalis* (OCDE nº 243), seu uso em regiões tropicais, como no Brasil, não é recomendado, pois seu uso acarretaria o risco de introdução de mais uma espécie exótica. Além disso, o uso de uma espécie representativa de ecossistemas de regiões tropicais é uma ferramenta necessária para o monitoramento ambiental tropical, uma vez que o gênero *Biomphalaria* possui ampla distribuição em regiões tropicais. Por esta razão, o uso da espécie *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos ajudará a aumentar a representatividade do ambiente aquático em estudos laboratoriais.

Cada vez mais, o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* tem sido utilizado como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos, exemplificado pelo aumento do número de estudos sobre esse molusco. Esta revisão considerou três pontos principais: primeiro, a viabilidade do uso de *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico; por fim, a avaliação de possíveis efeitos tóxicos causados por essas substâncias no organismo ou nas células do molusco. Os estudos incluídos nesta revisão forneceram informações a respeito do potencial deste molusco de água doce como modelo biológico, pois possui

um sistema imunológico diversificado e interações e possibilidades complexas entre o molusco e substâncias.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Descobrimos que o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* tem sido usado em testes de toxicidade há décadas. Apesar da crescente utilização do molusco como modelo biológico, e com base nos dados desta revisão, várias lacunas merecem atenção e pesquisa, tais como:

- 1) Desenvolvimento de estudos com o objetivo de padronização metodológica, utilizando a *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico, em estudos ecotoxicológicos.
- 2) Desenvolvimento de guias para padronização das condições experimentais como água (pH, temperatura, dureza, condutividade, alcalinidade e nitrato), fotoperíodo e alimentação antes e durante o experimento. Assim como o tempo de exposição, método de exposição, tamanho e quantidade do molusco, número mínimo de repetições e concentrações.
- 3) Estabelecimento de especificações robustas que permitam a interpretação dos resultados dos testes, através da descrição das principais alterações no molusco (comportamento, toxicidade, citotoxicidade e embriotoxicidade)
- 4) Realização de estudos que avaliem os efeitos da substância-teste não só no molusco adulto, mas também em diferentes fases da vida, desde o desenvolvimento embrionário até à maturidade sexual.

REFERÊNCIAS

ABAZA, B.E; HAMZA, R.S; FARAG, T.I; et al. Characterization of the hemocytes of susceptible and resistant *Biomphalaria alexandrina* snail. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 46, n. 3, p. 671 – 682, 2016.

ADEMA, C; HILLIER, L; JONES, C; et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. **Nat Commun**, v. 8, p. 15451, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms15451>.

ADRIAN J.; HIROKI, T; WARREN, H; et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity, **Toxicological Sciences**. v. 86, n. 1, p. 6 – 19, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>.

ALTENBURGER, R; BRACK, W; BURGESS, R.M; et al. Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. **Environ Sci Eur**. v. 31, p. 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0193-1>.

ANSALDO, M; NAHABEDIAN, D.E; DI FONZO, C; et al. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. **Sci Total Environ.**, v. 407, n. 6, p. 1923 – 8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.001>.

ARAÚJO, P.S; CAIXETA, M.B; BRITO, R.DA S; et al. Molluscicidal activity of polyvinylpyrrolidone (PVP)-functionalized silver nanoparticles to *Biomphalaria glabrata*: implications for control of intermediate host snail of *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop**. v. 211, p. 105644, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105644>.

AVELAR-FREITAS, B.A; ALMEIDA V.G; PINTO M.C.X; et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47: p. 307 – 315, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143437>.

BARBOSA, F.S.; BARBOSA, C.S. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 200 – 209, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000200007>.

BARBOUR, M.T; GERRITSEN J; SNYDER, B.D; et al. **Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition**. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C., 1999.

BAYNES, A; PINO G.M; DUONG, G.H; et al. Early embryonic exposure of freshwater gastropods to pharmaceutical 5-alpha-reductase inhibitors results in a surprising open-coiled “banana-shaped” shell. **Sci. Rep.** v. 9, p. 1 – 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52850-x>.

BEEK, T; WEBER, F.A; BERGMANN, A; et al. Pharmaceuticals in the environment--Global occurrences and perspectives. **Environ Toxicol Chem.** v. 35, n. 4, p. 823 – 35, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3339>.

BEN Y; HU M; ZHANG X; et al. Efficient detection and assessment of human exposure to trace antibiotic residues in drinking water. **Water Res.** v. 15, p. 115699, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115699>.

BOLOGNESI, C; FENECH, M.. Mussel micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v. 7, n. 1125–1137, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.043>.

BORGES, C.M.C; AZEVEDO, C.M; ZILTON A.A. A contribution to the pathobiology of *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 193 – 198, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900030>.

BRACK, W; AISSA, S.A; BACKHAUS, T; et al. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. **Environ Sci Eur** v. 31, p. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2>.

CAIXETA, M.B; ARAÚJO, P.S; GONÇALVES, B.B; et al. Toxicity of engineered nanomaterials to aquatic and land snails: a scientometric and systematic review. **Chemosphere** v. 260, p. 127654, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127654>.

CAIXETA, M.B; ARAÚJO, P.S; RODRIGUES, C.C; et al. Rocha Risk assessment of iron oxide nanoparticles in an aquatic ecosystem: a case study on *Biomphalaria glabrata*. **J. Hazard. Mater.**, v. 401, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123398>.

CAIXETA, M.B; ARAÚJO, P.S; PEREIRA, A.C; et al. *Biomphalaria* embryotoxicity test (BET): 60 years of research crossing boundaries for developing standard protocols. **Sci Total Environ.** v. 833, n. 155211, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155211>.

CAMEY, T., VERDONK, N.H. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and the origin of the head organs. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 20: p. 93 – 121, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1163/002829670X00097>.

CAMPANA, O. & WLODKOWIC, D. Ecotoxicology Goes on a Chip: Embracing Miniaturized Bioanalysis in Aquatic Risk Assessment. **Environmental Science &**

Technology, v. 52, n. 3, p. 932 – 946, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03370>.

CASTILLO, M.G; HUMPHRIES, J.E; MOURÃO, M.M; et al. Biomphalaria glabrata immunity: post-genome advances. **J. Dev. Comp. Immunol.**, v. 104, p. 103557, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103557>.

CAVALCANTI, M.G.S; MENDONÇA, A.M.B; DUARTE, G.R; et al. Morphological characterization of hemocytes from Biomphalaria glabrata and Biomphalaria straminea. **Micron**, v. 43, p. 285 – 291, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.09.002>.

CHENG, T.C., SULLIVAN, JT. The effect of copper on the heart-rate of Biomphalaria glabrata (mollusca: pulmonata). **Comp. gen. Pharmac.**, v. 4, p. 37 – 41, 1973. DOI: [https://doi.org/10.1016/0010-4035\(73\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0010-4035(73)90018-9).

CHENG, T.C., SULLIVAN, JT. Alterations in the Osmoregulation of the Pulmonate Gastropod Biomphalaria glabrata Due to Copper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 29, p. 101 – 104, 1977. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90179-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(77)90179-3).

Collins, A.R; Oscoz, A.A; Brunborg, G; et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143 – 151, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.

DE ALBUQUERQUE, L.P; PONTUAL, E.V; SANTANA, G.M; et al. Toxic effects of Microgramma vacciniifolia rhizome lectin on Artemia salina, human cells, and the schistosomiasis vector Biomphalaria glabrata. **Acta Trop.**, v. 138: p. 23 – 7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.005>.

DOUGLAS J.S.; SULLIVAN, J.T. Effects of ammonium chloride on microbicidal activity in hemocytes of Biomphalaria glabrata (Mollusca: Pulmonata). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 16, p. 339 – 343, 1992.

DUARTE, G.F; RODRIGUES, J; FERNANDES, É.K.K; et al. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. **J. Invertebr. Pathol.** v. 125, p. 31 – 36, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.013>.

FENECH, M; CHANG, W.P; KIRSCH-VOLDERS, M; et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat Res.**, v. 534, p. 65 – 75, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00249-8).

GARCIA, B; PIERCE, A; GOURBAL, R. J; et al. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1001115, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001115>.

GARCIA, V.S.G; TALLARICO, L.F; ROSA, J.M; et al. Multiple adverse effects of textile effluents and reactive Red 239 dye to aquatic organisms. **Environ Sci Pollut Res** v. 28, p. 63202 – 63214, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15115-7>.

GBIF. Global Biodiversity Information Facility. **GBIF Occurrence Download**. 2022. DOI: <https://doi.org/10.15468/dl.kz9rwr>

Geboers, S; Haenen, S; Mols, R; et al. Intestinal behavior of the ester prodrug tenofovir DF in humans. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 131, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.002>.

GOLOVKO, O; ÖRN, S; SÖRENGÅRD, M; et al. Occurrence and removal of chemicals of emerging concern in wastewater treatment plants and their impact on receiving water systems, **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 142122, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142122>.

GRAZEFFE, V.S; TALLARICO, L.F; PINHEIRO, A.S; et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutat. Res.**, v. 654, n. 1, p. 58 – 63, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.05.007>.

GUSTAFSON, K.D; BELDEN, J.B; BOLEK, M.G. The effects of the herbicide atrazine on freshwater snails. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 5, p. 1183 – 97, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1469-x>.

HUMPHRIES, J.E.; DENECKER, L.E. Characterization of a Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in *Biomphalaria glabrata* and its potential regulation by NF-kappaB. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 86, p. 118 – 129, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.003>.

KAUR, S; BAYNES, A; LOCKYER, A.E; et al. Steroid Androgen Exposure during Development Has No Effect on Reproductive Physiology of *Biomphalaria glabrata*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0159852, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159852>.

KAWANO, T; OKAZAKI, K; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, p. 25 – 32. 1992.

KAWANO, T; NAKANO, E; WATANABE, L. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. In: Fiocruz (Ed.), **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinar**. Carvalho, OS., Coelho, PMZ., and Lenzi HL, Rio de Janeiro, p. 347 – 391, 2008.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae): I - Duração do

período embrionário. **Revista de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 57 – 64, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101976000100005>.

KRISTOFF, G; CACCIATORE, L.C; VERRENGIA GUERRERO, N.R; et al. Effects of the or-ganophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activ-ity of *Biomphalaria glabrata*. **Chemosphere**. v. 84, p. 585 – 591, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.058>.

LIMA, M.V; SIQUEIRA, W.N; SILVA, H.A.M.F; et al. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 26, n. 4, p. 3350 – 3356, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3848-3>.

LIMA, M.V; PEREIRA, M.I.A; FILHO, P.E.C; et al. Studies on Toxicity of Suspensions of CdTe Quantum Dots to *Biomphalaria glabrata* Mollusks. **Environ Toxicol Chem.**, v. 38, n. 10, p. 2128 – 2136, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4525>.

MAHMOOD, A.R; AL-HAIDERI, H.H; HASSAN, F.M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. **Advances in Public Health**, v. 2019, p. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7851354>.

MARTINS-SOUZA, R.L; PEREIRA, C.A.J; FILHO, O.A.M; et al. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 185 – 192, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900029>.

MELO, A.O; DOS SANTOS, D.B; SILVA, L.D; et al. Molluscicidal activity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride on the early-life stages and adults of the *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Chemosphere** v. 216, p. 365 – 371, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.035>.

MOHER, D; LIBERATI, A; TETZLAFF, J; et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS Med.**, 21; v. 6, n. 7, p. e1000097, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.

MONA, M.H; GAAFAR, R.G; HELAL, I.B; et al. Evaluation of cytotoxic effects of atrazine and glyphosate herbicides on *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, n. 2, p. 68 – 75, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.05.004>.

MONTE, T.C.C; CHOMETON, T.Q; BERTHO, A.L; et al. Changes in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* infected with *Echinostoma paraensei* and exposed to glyphosate-based herbicide. *J Invertebr Pathol.* v. 160, p. 67 – 75, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.11.007>.

MOSS, D.M; DOMANICO, P; WATKINS, M; et al. Simulating Intestinal Transporter and Enzyme Activity in a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Tenofovir Disoproxil Fumarate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00105-17>.

MÜNZINGER, M.L. & GUARDUCCI. The effect of low zinc concentrations on some demographic parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say), mollusca: gastropoda. **Aquat. Toxicol.**, v. 12, p. 51 – 61, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90019-7).

NAKANO, E; WATANABE, L.C; OHLWEILER, F.P; et al. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutat. Res.**, v. 536, p. 145 – 154, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(03\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(03)00042-1).

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. **Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of**

Chemicals. Section 2 OECD Publishing, Paris, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>.

OLIVEIRA-FILHO, E.C; CAIXETA, N; SIMPLÍCIO, N; et al. Implications of water hardness in ecotoxicological assessments for water quality regulatory purposes: a case study with the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Braz. J. Biol.** v. 74, p. 175 – 180, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.24212>.

OLIVEIRA-FILHO, E.C; FILHO, J.S; NOVAIS, L.A; et al. Effects of γ -Fe₂O₃ nanoparticles on the survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and their elimination from this benthic aquatic snail. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 23, n. 18, p. 18362-8, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6998-1>.

OLIVEIRA-FILHO, E.C; MUNIZ, D.H.F; CARVALHO, E.L; et al. Effects of AgNPs on the Snail *Biomphalaria glabrata*: Survival, Reproduction and Silver Accumulation. **Toxics.**, v. 7, n. 1, p. 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics7010012>.

OLIVIER, L; HASKINS, W.T; GURIAN, J. The action of very low concentrations of sodium pentachlorophenate on freshly laid eggs of *Australorbis glabratus*. **Bull. World Health Organ.** v. 27, p. 87, 1962.

OUZZANI, M; HAMMADY, H; FEDOROWICZ, Z; ELMAGARMID, A. Rayyan - a web and mobile app for systematic reviews. **Syst Rev.**, v. 5, p. 210, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.

PENA, R.V; MACHADO, R.C; CAIXETA, M.B; et al. Lauric acid bilayer-functionalized iron oxide nanoparticles disrupt early development of freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Acta Trop.**, v. 229, p. 106362, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106362>.

PEREIRA, C.A; MARTINS-SOUZA, R.L; COELHO, P.M; et al. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, v. 98, n. 3, p. 224 – 33, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.002>.

PEREIRA, C.A; MARTINS-SOUZA, R.L; CORRÊA, A.J; et al. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Parasite Immunol.**, v. 30, n. 12, p. 610-9, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01062.x>.

PIERI, O.S.; JURBERG, P. Comportamento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) como critério de toxicidade em ensaios biológicos com moluscidas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 76, n. 2, p. 147 – 160, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761981000200006>.

PILA, E.A; TARRABAIN, M; KABORE, A.L; et al. A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 3, p. e1005513, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005513>.

REID, A.J; CARLSON, A.K; CREED, I.F; et al. Ormerod Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity **Biol. Rev.**, v. 94, n. 3, p. 849 – 873, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>.

RIVERO-WENDT, C.L.G; BORGES, A.C; OLIVEIRA-FILHO, E.C; et al. Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 605 – 615, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4238/2014.January.28.6>.

SALICE, C.J.; ROESIADI, G. Resistance to cadmium and parasite infection are inversely related in two strains of a freshwater gastropod. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 21, p. 1398–1403, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210710>.

SANTOS, F.T.J; SIQUEIRA, W.N; SANTOS, M.L.O; et al. Radiosensitizer effect of usnic acid on *Biomphalaria glabrata* embryos. **Int J Radiat Biol.**, v. 94, n. 9, p. 838 – 843, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1492757>.

SCHUIJT, L.M; PENG, F.J; VAN DEN BERG, S.J.P; et al. (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. **Sci Total Environ.** v. 795, p. 148776, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>.

SINGH, N.P; MCCOY, M.T; TICE, R.R; et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184 – 191, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

SIQUEIRA, W.N; FRANÇA, E.J; PEREIRA, D.R; et al. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**, v. 249, p. 126218, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126218>.

SIQUEIRA, W.N; FRANÇA, E.J; PEREIRA, D.R; et al. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 28, n. 48, p. 69343 – 69353, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15529-3>.

SMINIA, T; BORGHART, R; VAN DER LINDE, A.N. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell Tiss Res.**, v. 153: p. 307 – 326, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00229161>.

SOUTHERLAND, M.T. & STRIBLING, J.B. **Status of biological criteria development and implementation.** In W.S. Davis and T.P. Simon (editors). Biological assessment and criteria: Tools for water resource planning and decision making. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, p. 81 – 96, 1995.

SOUZA, C.R; RIBEIRO, M.F; SOARES, M.F; et al. Environmental elimination estimate and literature review of ecotoxicological aspects of the main widely used antiretrovirals in Brazil. **Research, Society and Development.** v. 11, n. 10, p. e368111032975, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32975>.

SULLIVAN, J.T. & CHENG, T.C. Comparative Mortality Studies on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) Exposed to Copper Internally and Externally. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, p. 255 – 257, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(76\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90131-2).

SULLIVAN, J.T.; CASTRO, L. Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine. **J Invertebr Pathol.**, v. 90, n. 1, p. 32-8, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.04.005>.

TALLARICO, L.F; BORRELY, S.I; HAMADA, N; et al. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 110, p. 208-15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.005>.

TALLARICO, L.F. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. **Am. Malacol. Bull.** v. 33, n. 2, p. 330 – 336, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>.

VASQUEZ, R.E. & SULLIVAN, J.T. Hematopoietic tissue allograft in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. **Dev**

Comp Immunol, v. 25, p. 561 – 564, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00022-2](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00022-2).

WANG, Y; BAYNES, A; RENNER, K.O; et al. Uptake, Elimination and Effects of Cosmetic Microbeads on the Freshwater Gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Toxics**, v, 10, n. 2, p. 87, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics10020087>.

WHO. World Health Organization. Molluscicide screening and evaluation. **Bull. World Health Organ.** v. 33, p. 567 – 581, 1995.

WILKINSON, J.L; BOXALLA, A.B.A; KOLPIN D.W; et al. Pharmaceutical pollution of the world's rivers **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 119, n. 8, p. e2113947119, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>.

WOOD, T.P; DUVENAGE, C.S.J; ROHWER, E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. **Environ Pollut.** v. 199, p. 235 – 243, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.030>.

CAPÍTULO 3: Padronização *in vitro* do ensaio de citotoxicidade utilizando os hemócitos de *Biomphalaria glabrata* como marcador biológico para estudos ecotoxicológicos de resíduos farmacêuticos

RESUMO

Durante décadas, os moluscos têm sido utilizados como modelo biológicos para estudos ecotoxicológicos. *Biomphalaria glabrata* é uma espécie de água doce considerada como bioindicadores de qualidade da água. Levando em consideração a importância da implementação de novos modelos biológicos em estudos ecotoxicológicos, o objetivo com este trabalho foi padronizar o ensaio de citotoxicidade utilizando os hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, para estudos da ecotoxicologia de resíduos farmacêuticos. Para isso, moluscos, com tamanho aproximado de 12 mm foram selecionados (n = 100/réplica) e em seguida, foi coletada sua hemolinfa por meio de punção cardíaca. Em seguida os hemócitos foram expostos ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) nas concentrações, 300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 µg/L, 30 µg/L, 3 µg/L e 300 ng/L e incubados por 1, 3, 6 e 24 horas em banho maria a 28 °C. Em seguida, foi avaliada a viabilidade, atividade metabólica, índice de fagocitose dos hemócitos após exposição em diferentes meios de cultura. A partir desse estudo, foi possível otimizar os melhores parâmetros, como tempos de incubação com o fármaco, o tempo de incubação com as micropartículas, corantes e meio de exposição das células ao TDF. Destaca-se também, a necessidade da realização de novos estudos para avaliar outros tipos de resíduos.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*; ecotoxicidade; padronização; resíduos farmacêuticos.

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, os gastrópodes têm sido utilizados como modelo biológicos para estudos ecotoxicológicos de diversos poluentes emergentes, incluindo resíduos farmacêuticos. Nesse sentido, os moluscos de água doce têm se mostrado um potencial modelo biológico para análises ecotoxicológicas do meio ambiente aquático (Baynes *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2019; Caixeta *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2019; Oliveira-Filho *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020; Samsi *et al.*, 2017; Druart *et al.*, 2012;

Subba *et al.*, 2021). O meio ambiente aquático representa mais de 70% do planeta Terra e é composto, em sua maioria, por seres vivos invertebrados. Esses seres são vitais para sustentar muitos ecossistemas, pois desempenham papéis importantes fornecendo alimento para diversos consumidores nas cadeias tróficas (Abílio *et al.*, 2007; Alberto-Silva *et al.*, 2020).

Biomphalaria glabrata é uma espécie de molusco invertebrado pertencente à família Planorbidae (Lewis *et al.*, 2001). Por ser um ser vivo com capacidade de filtração, esses moluscos são considerados excelentes bioindicadores de qualidade da água, pois são particularmente sensíveis às mudanças provocadas nesse ambiente aquático. Entretanto, a utilização destes moluscos, em específico, para análises ecotoxicológicas ainda está pouco padronizada. Vários quesitos devem ser atendidos para o desenvolvimento de protocolos de padronização de ensaios para sua utilização na ecotoxicologia. Para isso, todos os métodos disponíveis utilizados na avaliação ecotoxicológica devem ser considerados e avaliados (Tallarico *et al.*, 2015).

Desta forma, vários aspectos são importantes no desenvolvimento de ensaios para avaliações ecotoxicológicas utilizando o molusco *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico. Contudo, alguns aspectos, como avaliações citotoxicológicas não estão bem padronizadas. Por este motivo, no presente trabalho teve-se como objetivo avaliar alguns pontos importantes em ensaios de citotoxicidade utilizando os hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, a fim de contribuir para a padronização desses ensaios no âmbito da ecotoxicologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Biomphalaria glabrata

Para a realização da padronização dos experimentos, foram utilizados moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* linhagem Belo Horizonte (Imagem 5), obtidos na Lagoa da Pampulha (WGS84 19°51'09" S; 43°58'42" O), os quais são mantidos no Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Figura 5. Fotografia do molusco *Biomphalaria glabrata* linhagem Belo Horizonte.



Fonte: Autor.

Manutenção do molusco

Os moluscos são mantidos e criados em caixas de água (0,75 x 0,75 x 0,65 m), com volume aproximado de 200 litros de água (filtrada e livre de cloro). A temperatura de criação é de 25 ± 2 °C, com renovação constante da água e semanalmente, é realizada a limpeza e a renovação total da água do aquário. Todos os moluscos do aquário de criação são alimentados, sem restrição, com alface orgânica (*Lactuca sativa*) livre de pesticida e higienizado com solução de ácido acético (CH_3COOH) a 0,005%. Uma vez por semana, os moluscos são suplementados com cerca de 200 mg de carbonato de cálcio (CaCO_3) (Pellegrino e Katz, 1968).

Características da água do aquário de criação

As análises de água foram realizadas no Laboratório de Saúde Pública / Água da Faculdade de Farmácia da UFMG. Antes da realização de quaisquer experimentos, um volume aproximado de dois litros de água é coletado do aquário de criação para avaliação de suas propriedades físico-químicas e microbiológicas.

Dureza total e parcial

Para a análise da dureza total (2340 C), de magnésio (3500-Mg) e de cálcio (3500-Ca B) da água, foram utilizados os ensaios titulométricos padronizados pela *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW). A mensuração da dureza total da água do aquário de criação dos moluscos, segue o princípio de que o ácido etilenodiaminotetracético e outros sais (EDTA) formam um complexo solúvel quelatado quando adicionados a uma solução de certos cátions metálicos. Com a adição de uma pequena quantidade de corante (Negro de eriocromo T), a uma solução com pH ajustado de 10, a titulação com EDTA (padronizado) provoca a mudança da coloração da solução de vinho para azul, assim sendo possível quantificar a dureza da água. A dureza de cálcio, segue o mesmo princípio, porém utilizando um indicador que combina apenas com cálcio (Murexida) (Baird e Bridgewater, 2017).

Alcalinidade

Assim como a dureza, a alcalinidade (2320 B) da água foi determinada pelo método titulométrico padronizado pela SMEWW. A análise baseia-se no princípio de que os íons hidroxila presentes em uma amostra reagem com adições de ácido padrão. A titulação é feita utilizando uma solução volumétrica de ácido sulfúrico 0.1N acompanhada com um indicador de pH, fenolftaleína. Esse indicador produz uma coloração rósea na solução na presença de hidróxidos e/ou carbonato. Um segundo indicador é utilizado (Laranja de metila), para indicação de bicarbonato na amostra (Baird e Bridgewater, 2017).

pH

A análise do pH da amostra de água foi realizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, método 5.2.19 (ANVISA, 2017). O valor de pH é a medida da concentração do íon hidrogênio de uma solução aquosa e diluída. A determinação potenciométrica do pH, aplicada neste estudo, foi realizada utilizando um eletrodo combinado de prata/cloreto de prata e vidro, acoplado em um pHmetro (Hanna - HI5222-01).

Cloro residual livre

Para a quantificação de cloro residual livre presente na amostra, foi utilizado o kit Spectroquant® Chlorine Test (Merck - 1.00598.0001) e o espectrofotômetro Spectroquant® Prove 100 (Merck). Em solução fracamente ácida, o cloro livre reage com dipropil-p-fenilenodiamina (DPD) formando uma coloração rósea, proporcionalmente a concentração de cloro residual livre presente na amostra, o qual pode ser mensurado fotometricamente.

Nitrato

Para determinação da concentração de nitrato na amostra, foi utilizado o método de salicilato com adaptações (Yang *et al.*, 1998). Esse método baseia-se na formação de íons nitrônio, na presença de um meio ácido (ácido sulfúrico) e com aquecimento. Esses íons interagem com salicilato, em meio básico (tartarato de sódio e potássio), formando um composto de cor amarela. A intensidade da coloração formada é proporcional a concentração de nitrato presente na amostra, a qual pode ser mensurado por espectrofotometria (Spectroquant® Prove 100).

Coliformes totais e Escherichia coli

A análise microbiológica foi realizada utilizando o kit Readycult® Coliforms 100 (Merck – 1012980001). Esse kit é um caldo de enriquecimento seletivo para a detecção simultânea de presença ou ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água. Para o ensaio, uma ampola é adicionada em 100 mL de amostra de água e incubados por 24 horas a 36 °C. A presença de coliformes totais é indicada quando o caldo apresentar uma coloração azul e *E. coli* pela emissão de fluorescência sob luz ultravioleta (SMEWW 9223 B) (Baird e Bridgewater, 2017).

Solução salina balanceada de Chernin

Para o preparo da solução salina balanceada de Chernin (CBSS) (Tabela 4), é necessário dissolver os sais cloreto de sódio (48 mM), cloreto de potássio (2 mM), fosfato de dissódico (0.5 mM), bicarbonato de sódio (0,6 mM) e sulfato de magnésio (1.8 mM),

em 800 mL de água purificada. Em seguida, em outro recipiente, deve-se dissolver isoladamente o cloreto de cálcio (3,6 mM), em 150 mL de água purificada. Após dissolvido completamente, juntar ambas as soluções e adicionar glicose (5,5 mM). O volume final deve ser ajustado para 1 litro com água purificada (Chernin, 1963).

Tabela 4. Preparo da solução salina balanceada de Chernin.

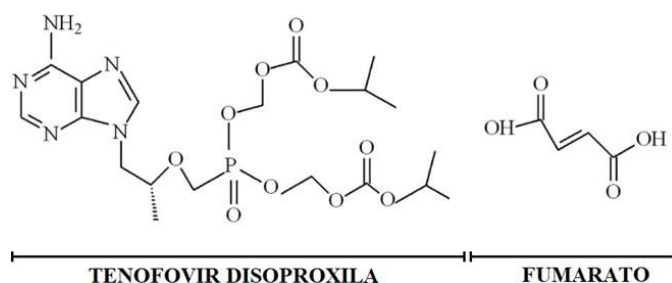
Reagente	MM (g/mol)	Fórmula química	Quantidade
Cloreto de sódio	58,5	NaCl	2,80 g
Cloreto de potássio	74,5	KCl	0,15 g
Fosfato de dissódio	141,9	Na ₂ HPO ₄	0,07 g
Sulfato de magnésio	246,5	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,45 g
Cloreto de cálcio	147,0	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,53 g
Bicarbonato de sódio	84,0	NaHCO ₃	0,05 g
Glicose	180,2	C ₆ H ₁₂ O ₆	1,0 g
Água purificada (q.s.p.)	18,0	H ₂ O	1,0 L

Legenda: MM = Massa Molar

Solução teste de Fumarato de Tenofovir Desoproxila

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) (Figura 6) foi selecionado como substância teste para esta pesquisa e servirá como padrão para as pesquisas futuras. Esse fármaco foi obtido por meio da Fundação Ezequiel Dias (Funed). Para realização dos ensaios, o antirretroviral foi solubilizado em CBSS na concentração de 3,0 g/L. Em seguida, a solução de CBSS+TDF foi diluída para a obtenção das concentrações teste: 300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 µg/L, 30 µg/L, 3 µg/L e 300 ng/L.

Figura 6. Estrutura química do Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF).



Fonte: Autor.

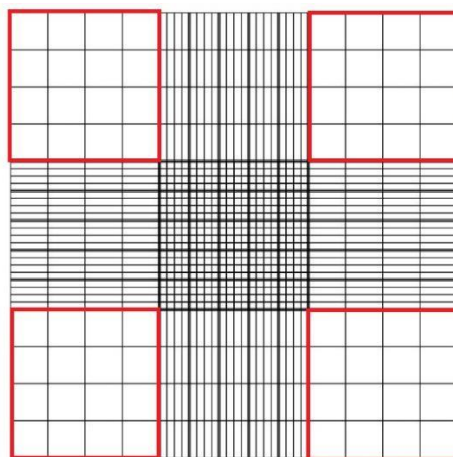
Obtenção dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*

A obtenção dos hemócitos seguiu a metodologia descrita por Pereira *et al.*, 2006, com adaptações. Resumidamente, moluscos com tamanho aproximado de 12 ± 2 mm, foram selecionados ($n = 100/\text{réplica}$) do aquário de criação e transferidos para um recipiente de plástico contendo a mesma água do aquário de criação. Em seguida, a concha dos moluscos foi limpa com álcool 70% borrifado em um pedaço de papel toalha. Após limpo, com auxílio de uma seringa (agulha 23G), a concha foi perfurada na região cardíaca do molusco, em um ângulo de 45° , e a hemolinfa depositada sobre a concha, foi coletada. A hemolinfa coletada, foi cuidadosamente transferida para um tubo de vidro siliconizado com Sigmacote (Sigma-Aldrich - SL2), limpo com CBSS, onde ficou sedimentando por três minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para outro tubo, enquanto os fragmentos de concha e/ou impurezas maiores, ficaram depositadas sobre o fundo do tubo. O sobrenadante recolhido foi centrifugado (Sigma 4K15) a 700 rpm (80 G) durante 10 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com CBSS, respeitando o volume original.

Quantificação de hemócitos

Antes da exposição dos hemócitos, o *pool* de células obtidas por meio da hemolinfa coletada do *Biomphalaria glabrata* deve ser quantificado. Para quantificação dessas células, a amostra é diluída na concentração de 1:10 em CBSS e transferida para uma câmara de Neubauer (Global Optics – 7301-1B), posicionada em um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Em seguida, os hemócitos presentes nos quatro quadrantes externos da câmara (Figura 7) são contados e sua concentração da amostra é dada pela fórmula: hemócitos por mililitro = média dos hemócitos contados x fator de diluição x 10^4 . Após contagem, a concentração de hemócitos era ajustada para obter uma concentração de $1,0 \times 10^5$ hemócitos em $250 \mu\text{L}$ (Pereira *et al.*, 2006).

Figura 7. Imagem representativa da câmara de Neubauer.



Legenda: Os quadrados vermelhos indicam a área que deve ser feita a contagem dos hemócitos para quantificação total na amostra. **Fonte:** Autor.

Modelo de exposição *in vitro* dos hemócitos

O método de exposição *in vitro* dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* foi adaptado de Pereira *et al.*, (2006). Resumidamente, um total de 250 μL de amostra ($1,0 \times 10^5$ hemócitos) foram distribuídos em tubos de vidro siliconizado contendo 250 μL de CBSS (9 tubos por tempo de exposição). Em seguida, adicionaram-se 500 μL de TDF nas concentrações 300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 $\mu\text{g/L}$, 30 $\mu\text{g/L}$, 3 $\mu\text{g/L}$ e 300 ng/L nos grupos tratamento. Para o controle positivo e negativo, foram adicionados 500 μL de CBSS e metanol a 5%, respectivamente. Os tubos foram então vedados e incubados por 1, 3, 4, 6 e 24 horas em banho maria a 28 °C.

Análise de viabilidade

A análise de viabilidade foi realizada por meio do ensaio Azul de Tripán (Dean *et al.*, 2004). Para este propósito, os hemócitos previamente tratados foram diluídos na proporção 1:10 em CBSS contendo 0,4% de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, T8154) e imediatamente transferidos para uma câmara de Neubauer (Global Optics – 7301-1B), posicionada em um microscópio óptico. Em seguida, os hemócitos presentes nos quatro quadrantes externos da câmara (Figura 7) foram quantificados, diferenciando as células coradas e não coradas de azul. A viabilidade dos hemócitos presentes na amostra foi dada

pela seguinte fórmula: hemócitos viáveis (%) = número de hemócitos não corados / total de hemócitos (Pereira *et al.*, 2006).

Análise de diferenciação celular

Para a diferenciação celular dos hemócitos em granulócitos ou hialinócitos, 10 µL da amostra foi diluída em CBSS contendo 0.33% de vermelho neutro (Sigma-Aldrich, N2889) na proporção de 1:10 e transferida para uma câmara de Neubauer (Global Optics – 7301-1B), posicionada em um microscópio óptico. Em seguida, as células coradas foram examinadas no microscópio óptico, ampliação de 200 e 400x. Neste estudo, robustamente os hemócitos corados em vermelho foram classificados como granulócitos e os não corados como hialinócitos (Bezerra *et al.*, 1997; Martins-Souza *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006).

Ensaio de atividade metabólica

Para avaliação da atividade metabólica dos hemócitos, o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich - M2128), previamente descrito por Bezerra *et al.* (1997), foi utilizado com modificações. Resumidamente, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada tubo de vidro contendo hemócitos previamente tratados. Em seguida, os tubos foram vedados e incubados em banho maria a 28 °C por 1, 3, 6 e 24 horas, no escuro. Após incubação, foi adicionado 0,5 mL da solução de Ácido clorídrico 0,1N em Isopropanol absoluto ou dimetilsulfóxido (DMSO) e incubados novamente por 10 minutos. Os tubos foram então agitados com vórtex e centrifugados a 1.400 rpm (160 g) durante 10 minutos a 4 °C. Em seguida, 250 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de transferência 96 poços, em triplicata. A leitura foi feita a 570 nm, em um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC). O branco era composto por todos os reagentes envolvidos na análise, sem a presença de hemócitos. O branco de solvente era composto por todos os reagentes mais 5% de metanol, sem a presença de hemócitos (Pereira *et al.* 2006).

Análise do índice de fagocitose celular

A análise do índice de fagocitose dos hemócitos após exposição ao TDF foi determinada de acordo com Fryer e Bayne (1996), com modificações. Micropartículas de dióxido de silício de 1 µm de diâmetro (Sigma, 56798-5ML-F), foram adicionadas as amostras contendo hemócitos tratados com TDF ou CBSS (controle negativo) e incubadas por 1, 3 e 24 horas a 28 °C em banho maria. Após a incubação, 100 µL de cada amostra foram transferidos para lâminas de microscopia, as quais ficaram em câmara úmida por 60 minutos para adesão celular. As imagens, 100 células por grupo, foram capturadas por meio do microscópio Nikon Eclipse E200 equipado com uma câmera digital e o software NIS Elements, versão 2.3 (colocar país). O valor do índice de fagocitose é dado pela razão entre o número de hemócitos capazes de fagocitar as micropartículas administradas pelo número total de hemócitos registrados (Hillyer *et al.*, 2005)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Manutenção do molusco

Folhas de alface (*Lactuca sativa*), são amplamente utilizadas na alimentação de moluscos, incluindo a espécie *Biomphalaria glabrata*, porém, vários estudos destacam a importância de uma dieta suplementada (Tabela 5). Essa suplementação resulta em maior capacidade reprodutiva, aumento no tamanho das conchas, aumento da taxa de sobrevivência (Eveland & Ritchie, 1972; Chieffi, 1975; Andrade *et al.*, 1978; Rosa *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2020). Além disso, o fotoperíodo no qual os moluscos estão submetidos também é capaz de influenciar no desenvolvimento embrionário e na fertilidade dos moluscos. Assim, é recomendado controlá-lo, utilizando o fotoperíodo de 12:12 horas (Barbosa *et al.*, 1987).

Tabela 5. Exemplo de opções de suplementação alimentar para *Biomphalaria glabrata*.

Referência	Suplementação	Quantidade	Frequência
Pellegrino e Katz, 1968	Ração mais Carbonato de cálcio	200 mg/molusco	Semanalmente
Eveland & Ritchie, 1972	Fórmula padrão	<i>ad libitum</i>	Diariamente
Andreade <i>et al.</i> , 1978	Ração de peixe	3 mg/molusco	Diariamente

	(Aquariol)		
Paz <i>et al.</i> , 2020	Sulfureto de cálcio	20 mg/L	Diariamente
Wang <i>et al.</i> , 2022	Ração de peixe (TetraMin)	10% da massa do molusco	Dias alternados

Características da água do aquário de criação

Na tabela 6 estão apresentadas uma média da análise de cinco amostras, coletadas em diferentes semanas da água do aquário de criação.

Tabela 6. Características físico-químicas e microbiológicas da água do aquário de criação dos moluscos de cinco amostras distintas coletadas antes dos experimentos.

Parâmetros	1	2	3	4	5	Média
Alcalinidade bicarbonato (mg/L de CaCO ₃)	35,2	35,6	35,4	35,7	35,3	35,4 ± 0,2
Alcalinidade carbonato (mg/L de CaCO ₃)	0	0	0	0	0	0,0 ± 0,0
Alcalinidade hidróxido (mg/L de CaCO ₃)	0	0	0	0	0	0,0 ± 0,0
Cloro residual livre (mg/L)	0	0,1	0	0,1	0,2	0,1 ± 0,1
Dureza total (mg/L de CaCO ₃)	49	48,6	47,8	48,8	48,1	48,5 ± 0,5
Dureza de cálcio (mg/L de Ca)	15,7	15,9	16,4	16,2	16,4	16,1 ± 0,3
Dureza de magnésio (mg/L de Mg)	2,2	2,1	2,3	2,1	2,1	2,2 ± 0,1
pH	7,1	7	7,2	7,1	7,2	7,1 ± 0,1
Nitrato (mg/L)	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3 ± 0,1
Coliformes totais	+	+	+	+	+	Positivo (+)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	Negativo (-)

Testes envolvendo moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para ecotoxicológicos requerem a padronização dos parâmetros, incluindo a dureza da água. Levando em consideração a importância do cálcio na reprodução e desenvolvimento dos moluscos no aquário de criação, a dureza da água não pode ser inferior a 10 mg/L CaCO₃. Por este motivo, esse parâmetro deve ser monitorado durante

todo o experimento para evitar oscilações entre os resultados. Além disso, a água com maior dureza tem um efeito de redução da toxicidade, principalmente com metais (Oliveira-Filho *et al.*, 2014). Ao mesmo tempo, a dureza da água não pode ser baixa, uma vez que favorece diretamente o desenvolvimento do molusco dado que 80% do cálcio do molusco vem diretamente da água (Borghet e Puymbroeck, 1966).

Neste estudo, os moluscos foram suplementados semanalmente com carbonato de cálcio (Pellegrino e Katz, 1968) com o objetivo de reduzir problemas durante seu desenvolvimento, como conchas frágeis (Figura 8) (Oliveira-Filho *et al.*, 2014). Antes da suplementação alimentar dos moluscos, a dureza total e de cálcio da água do aquário de criação era $48,5 \pm 0,5$ mg/L CaCO_3 e $16,1 \pm 0,3$ mg/L Ca, respectivamente. Por este motivo, a suplementação semanal dos moluscos com carbonato de cálcio é necessária, elevando consideravelmente a dureza total e de cálcio da água para $116,8 \pm 0,9$ mg/L CaCO_3 e $42,9 \pm 0,6$ mg/L Ca, respectivamente.

Figura 8. Fotografia de dois moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*.



Legenda: O molusco da esquerda é do tipo albino enquanto o da direita é pigmentado. O molusco pigmentado apresenta pontos de fragilidade na concha (seta vermelha), ocasionados pela baixa disponibilidade de cálcio na água, ambos com 65 dias de vida.

Fonte: Autor.

Mesmo que alguns moluscos possam apresentar pontos de fragilidade na concha em algum momento, por meio da suplementação de cálcio, após alguns dias é possível recuperá-la (Paz *et al.*, 2020). Levando em consideração a importância do controle da

dureza da água para o desenvolvimento do molusco, o monitoramento, desse e outros parâmetros, da água, durante o experimento, é essencial para realização de estudos ecotoxicológicos. A carência de cálcio na água pode provocar problemas durante seu desenvolvimento e influenciar no resultado da análise. Mortalidade, crescimento, ganho de peso, fertilidade e tamanho da concha são indicadores essenciais para estudos ecotoxicológicos pois indicam o estado fisiológico do molusco (Eveland & Haseeb, 2010; Thomas *et al.*, 1974)

Além da dureza, a temperatura da água é outro importante parâmetro, o qual deve ser controlado. A temperatura da água utilizada, principalmente durante a exposição do molusco apresenta grande variação na literatura. Grande parte dos estudos de ecotoxicidade, envolvendo *Biomphalaria glabrata*, utilizam a temperatura de 25°C durante a exposição. Contudo, essa temperatura pode variar de 20 (Münzinger e Guarducci, 1988) até 29 °C (Mona *et al.*, 2013). A padronização da temperatura da água é necessária, visto que pode alterar o desenvolvimento inicial dos moluscos, bem como a fertilidade (Kalinda *et al.*, 2017; McCreesh *et al.*, 2014; Tallarico, 2015).

Após análise, foi observado que a água utilizada para exposição e manutenção dos moluscos apresenta alcalinidade apenas na forma de bicarbonato na concentração de 35,5 mg/L CaCO₃. Para as demais formas, hidróxido e carbonato, não foram encontradas concentrações mensuráveis pelo método. Tal como a dureza, a alcalinidade desempenha um papel importante no desenvolvimento dos moluscos, mesmo que pouco explorada (Oliveira-Filho *et al.*, 2014).

Mesmo apresentando alta resistência a diferentes faixas de pH (O'Sullivan *et al.*, 2012), *Biomphalaria glabrata* tem maiores taxas de sobrevivência e fertilidade em faixas de pH neutro (7). Neste estudo, durante a realização de todos os ensaios de citotoxicidade, o pH da água foi acompanhado e teve como média 7,1 com desvio padrão de 0,1.

A partir das análises microbiológicas, foi possível observar a presença de coliformes totais e ausência de *Escherichia coli* na água. Resultado esperado, visto que a água presente no aquário de criação possui baixa concentração de cloro residual livre (0,1 mg/L). Essa presença de bactérias pode provocar um aumento da concentração de hemócitos na hemolinfa do *Biomphalaria glabrata*, estimulando sua produção. Por este motivo, além da renovação da água do aquário, é recomendado a realização de análises

microbiológicas da água para evitar variações entre os experimentos, ocasionados pela diferença da concentração dos hemócitos.

Solução salina balanceada de Chernin

A solução salina balanceada de Chernin foi desenvolvida baseando-se nas determinações químicas da hemolinfa do molusco *Australorbis glabratus* e adaptado para o gênero *Biomphalaria*. Todos os sais, exceto o cálcio, devem ser dissolvidos juntos em água purificada enquanto o cálcio deve ser dissolvido separadamente em água purificada. Como descrito anteriormente, a dissolução separada desse sal se deve ao fato de que, quando presentes na solução, os íons sulfatos reagem com o cloreto de cálcio deixando a solução turva. Essa turbidez formada pode influenciar nos ensaios, principalmente nos colorimétrico, e por este motivo, deve ser dissolvido de forma separada dos demais sais. Além dos sais, é adicionado glicose na composição do CBSS (Chernin, 1963).

Após o preparo, a solução deve ser esterilizada por filtração e armazenada em recipientes com tampa a 5 °C. Além disso, o preparo da solução em condições estéreis (capela de fluxo laminar) é essencial para reduzir as contaminações e aumentar a vida útil da solução (3 a 4 semanas), visto que não há adição de penicilina ou estreptomicina na solução. A não adição de antibiótico na solução é devido ao efeito que pode causar sobre o hemócito, como a estreptomicina que causa efeitos deletérios em caracóis intactos (Chernin, 1957). Por fim, o pH do meio recém preparado é mensurado ($7,4 \pm 0,2$) e caso necessário ajustado com 0,1N HCl (Chernin, 1963).

Alternativamente ao CBSS, outra solução usualmente utilizada para ensaios utilizando hemócitos de *Biomphalaria glabrata* é a solução salina fosfato-tampão (PBS) (Portet *et al.*, 2021; Melo *et al.*, 2020; Garate, *et al.*, 2020). A composição do PBS pode variar, mas normalmente é composto por uma combinação de sais, como cloreto de sódio, fosfato de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre a composição química das soluções CBSS e PBS.

Reagente	MM (g/mol)	CBSS	PBS
Cloreto de sódio (NaCl)	58,5	2,80 g	8,06 g
Cloreto de potássio (KCl)	74,5	0,15 g	0,22 g
Fosfato de dissódico (Na ₂ HPO ₄)	141,9	0,07 g	1,15 g

Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	246,5	0,45 g	-
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	147,0	0,53 g	-
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	84,0	0,05 g	-
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180,2	1,0 g	-
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	136,1	-	0,20 g

O PBS é um tampão isotônico utilizado para diluir diferentes biomoléculas (proteínas, enzimas e células) ou para limpeza celular, podendo ser combinado com outras substâncias para desempenhar diferentes funções. Além disso, é capaz de manter constante um determinado valor de pH por meio da adição de ácidos ou bases durante sua preparação. Contudo, quando comparado ao CBSS, é notória a diferença da concentração de cálcio entre as soluções, íon de grande relevância na fisiologia do molusco (Rosa *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2020; Oliveira-Filho *et al.*, 2014) visto que a osmolaridade aproximada do CBSS e da hemolinfa do molusco é de 110 ± 2 mOsm/L (Chernin, 1963; Lee e Cheng, 1972).

Solução teste de Fumarato de Tenofovir Desoproxila

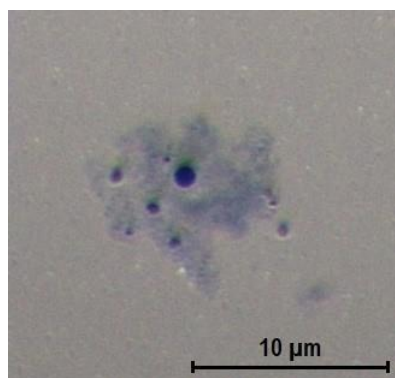
O Fumarato de Tenofovir Desoproxila possui solubilidade de 13,4 g/L em água purificada a 25 °C (de Christoforo e Penzak, 2004). Contudo, neste estudo, a solubilização do fármaco foi realizada no próprio meio de cultura dos hemócitos, o CBSS. Assim, concentração máxima atingida de solubilização foi de $3,0 \pm 0,2$ g/L. Após a solubilização do TDF em CBSS na concentração de 3 g/L, uma diluição seriada foi realizada para obter as concentrações testes: 300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 µg/L, 30 µg/L, 3 µg/L e 300 ng/L. Um total de 25 mL de cada concentração foi preparada, dividida em eppendorfs de 1,5 mL e armazenada a 4°C para posterior análise *in vitro*. Para análise *in vivo*, um volume maior de TDF foi preparado em todas as soluções para posteriormente serem misturadas aos aquários dos moluscos expostos ao fármaco. Para ambos, as mesmas soluções foram utilizadas durante todo o experimento para evitar influências sobre o resultado devido a diferentes concentrações.

Obtenção dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*

Para este experimento, um total de 100 moluscos foi necessário. Destes, 30 foram destinados para o ensaio de atividade metabólica MTT (10 por réplica / triplicata); 30

para a atividade fagocítica (10 por réplica / triplicata); 30 para avaliação de óxido nítrico (10 por réplica / triplicata); e por fim 10 para análise de viabilidade e morfologia dos hemócitos. Durante a limpeza da concha do molusco, deve-se tomar cuidado para não expor o molusco diretamente ao álcool 70%, pois o molusco pode se retrair para o interior da concha e expelir sua hemolinfa em seguida. Essa hemolinfa não deve ser coletada pois ao entrar em contato com o álcool, os hemócitos sofrem lise celular, inviabilizando o ensaio (Figura 9).

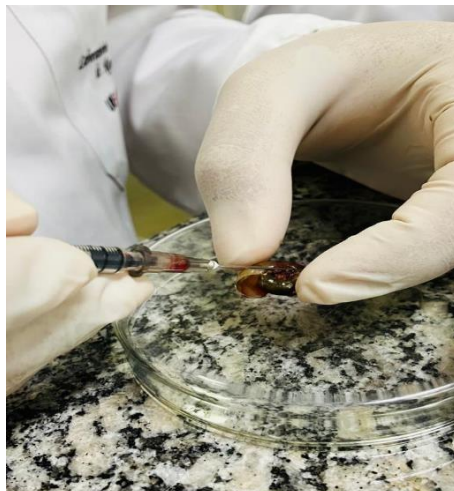
Figura 9. Hemócito lisado de *Biomphalaria glabrata* exposto ao álcool 70% e corado com Azul de Tripán.



Fonte: Autor.

Após a preparação do molusco, a obtenção dos hemócitos deve ser realizada por meio da punção cardíaca no molusco. Durante a punção, deve-se evitar a sucção interna da hemolinfa. Essa prática pode acabar captando células que não são de interesse, como tecido epitelial, para os estudos citotóxicos com *Biomphalaria glabrata*. Para evitar a contaminação da amostra, apenas a hemolinfa que ficar depositada sobre a concha e deve ser coletada (Figura 10) (Bezerra *et al.*, 1997).

Figura 10. Fotografia exemplificando o processo de coleta da hemolinfa sobre a concha do molusco *Biomphalaria glabrata* para posterior obtenção dos hemócitos.



Fonte: Autor.

Quantificação de hemócitos

Os ensaios de citotoxicidade envolvendo hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exigem uma padronização do número de células expostas em cada grupo. Esses ensaios estão diretamente relacionados a quantidade de hemócitos expostos a uma determinada substância. Por este motivo, em todos os experimentos realizados neste estudo (atividade metabólica, índice de fagocitose, produção de óxido nítrico, viabilidade e diferenciação celular) foi utilizada uma concentração celular de $1,0 \times 10^5$ hemócitos em 250 μL . Para população de *Biomphalaria glabrata* linhagem BH, a média de hemócitos presente na amostra de hemolinfa de 100 moluscos foi de $11,4 \pm 1,5 \times 10^5$ por mililitro.

Modelo de exposição *in vitro* dos hemócitos

A exposição dos hemócitos *in vitro* foi realizada fora do organismo dos moluscos, envolvendo diferentes meios de exposição. Para saber qual a melhor forma de tratamento dos hemócitos fora do organismo do molusco, durante o tratamento dos hemócitos ao fármaco (TDF), três diferentes meios de exposição foram testados para avaliar qual melhor se adapta ao ensaio: (i) microplacas de 96 poços (KASVI), (ii) tubos de cultura de plástico (Duran®) e (iii) tubos de vidro (Vacuette).

As microplacas de 96 poços são ideais para tratamentos com múltiplos grupos. Observamos que essas microplacas, quando comparadas aos tubos, são mais simples de se trabalhar, não havendo a necessidade de transferir a amostra para outro lugar para leitura da atividade metabólica por exemplo. Contudo, para alguns ensaios essa forma de exposição não é ideal, como viabilidade e índice de fagocitose. Nessas microplacas, os hemócitos acabam aderindo as paredes e há uma redução considerável de células. Além disso, no caso da microplaca de 96 poços, o limite de volume por poço é de 300 μ L, exigindo uma mudança na concentração de células por microlitro.

Os tubos de plástico são fáceis de se manusear e permitem volumes maiores de amostra. Contudo, devido ao material de sua composição, assim como a microplaca, ocorre adesão dos hemócitos na parede do tubo. Além disso, durante o ensaio de atividade metabólica, foi observada a adesão de formazan na parede. Mesmo após a adição do 0,1N HCl-Isopropanol ou DMSO o sal permaneceu na parede do frasco. Por este motivo, essa forma de exposição foi considerada como não adequado para esse tipo de ensaio.

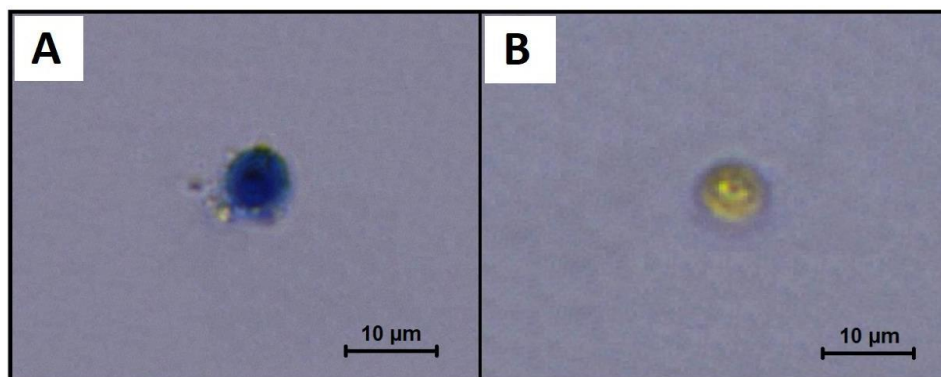
Por fim, tubos de vidro siliconizados com Sigmacote (Sigma-Aldrich - SL2) foram usados para exposição dos hemócitos. Comparando com as demais formas, tubos de plástico e microplacas, os tubos de vidro siliconizados apresentaram baixa agregação de hemócitos e maior viabilidade da utilização nos experimentos. Essa baixa agregação foi confirmada pela contagem total de células antes e após a exposição de 5 experimentos, não apresentando diferença significativa entre elas. Contudo, esses tubos de vidro devem ser siliconizados, uma vez que sem a presença do silicone ocorre a agregação dos hemócitos nas paredes dos tubos. Além disso, os tubos devem ser bem limpos com CBSS antes do experimento, pois a presença de resíduos do silicone no tubo é tóxica para os hemócitos, elevando até cinco vezes o número de células inviáveis no experimento.

Análise de viabilidade

A qualidade da amostra celular é essencial para experimentos *in vitro*. A avaliação da viabilidade celular através do ensaio de exclusão do corante Azul Tripán é um dos métodos mais antigos, comum, rápido e prático para medir a viabilidade. O Azul de Tripán é uma molécula impermeável à membrana celular e, portanto, só entra em células com membranas comprometidas e acumula-se em seu interior (Figura 11). Dentro da célula, o Azul Tripán liga-se às proteínas intracelulares deixando-as com coloração

azulada. Esse ensaio permite uma identificação e quantificação de células vivas (sem coloração) e mortas (azuladas) em uma determinada amostra (Strober, 2015).

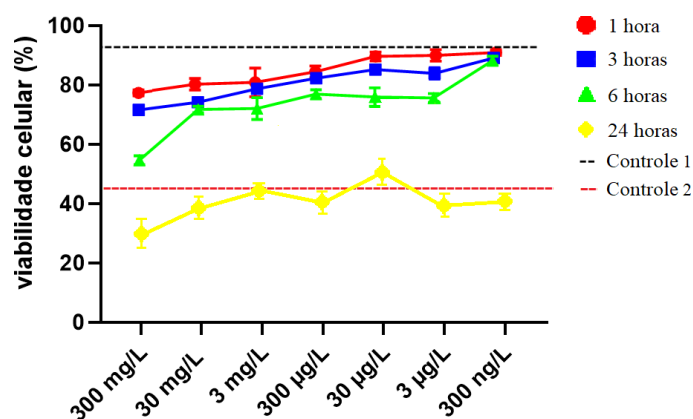
Figura 11. Microfotografia de hemócitos, tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após coloração com 0,4% de Azul de Tripán.



Legenda: A figura A representa um hemócito inviável (corado em azul). A figura B representa um hemócito viável (não corado). **Fonte:** Autor.

Neste estudo, antes e após o tratamento, os hemócitos de *Biomphalaria glabrata* foram avaliados quanto a sua viabilidade pelo ensaio de exclusão do corante Azul Tripán. Observou-se que a média de viabilidade dos hemócitos do grupo controle (expostos ao CBSS), antes da exposição foi de $93,2 \pm 6,7\%$ e após exposição $90,4 \pm 3,3\%$. Além disso, é possível observar uma correlação direta entre tempo de exposição e redução da viabilidade celular. Essa correlação também foi encontrada para a concentração de TDF, quanto maior a concentração do fármaco, maior a inviabilidade celular (Figura 12).

Figura 12. Análise de viabilidade dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* pelo ensaio de exclusão do corante Azul Tripán, após exposição ao TDF por 1, 3, 6 e 24 horas.



Legenda: Controle 1 = média da viabilidade dos hemócitos pertencentes ao grupo exposto ao CBSS por 1, 3 e 6 horas (linha pontilhada preta). Controle 2 = média da viabilidade dos hemócitos pertencentes ao grupo exposto ao CBSS por 24 horas (linha pontilhada vermelha). **Fonte:** Autor.

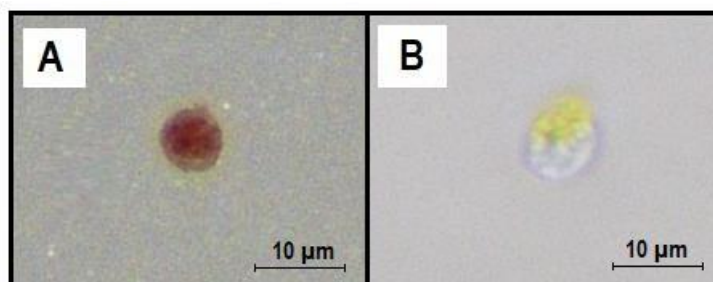
Não há dados na literatura sobre a avaliação, *in vitro*, da toxicidade do TDF sobre hemócitos de moluscos. Contudo, neste estudo, observou-se que o TDF em baixas concentrações ($< 300 \mu\text{g/L}$), não provocou diferença significativa ($p > 0,05$) na viabilidade dos hemócitos quando comparado ao controle negativo. Contudo, em concentrações mais altas ($> 30 \text{ mg/L}$), a citotoxicidade do Fumarato de Tenofovir Desoproxila é notória, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. Após 24 horas de exposição, foi observado um aumento considerável da quantidade de hemócitos inviáveis, tanto no grupo controle como tratamentos. Essa redução pode ser consequência da incapacidade do meio (CBSS) de manter as células viáveis por longos períodos.

As limitações deste tipo de ensaio é que existe uma grande diferença entre as formas de administração do fármaco. Em estudos, *in vitro*, a substância é injetada diretamente sobre a célula, e por isso, não é apenas uma representação da resposta de um organismo. Porém, ao mesmo tempo, essa forma de administração é altamente específica, favorecendo a análise e interpretação dos resultados, visto que a concentração testada no ensaio é conhecida.

Análise de diferenciação celular

Devido a citotoxicidade do vermelho neutro (Lowe e Pipe, 1994), neste estudo o corante foi utilizado exclusivamente para caracterização da população de hemócitos presentes na amostra. Para isso, é necessário realizar a diferenciação dos diferentes tipos de hemócitos (granulócitos ou hialinócitos). Os hialinócitos possuem um citoplasma agranular (basófilo), enquanto os granulócitos possuem um citoplasma granular (acidófilo). O corante vermelho neutro liga-se aos grânulos formando manchas vermelhas, sendo possível realizar assim a diferenciação celular (Figura 13). Na tabela 8 estão apresentados os resultados da caracterização da população de hemócitos do molusco *Biomphalaria glabrata* utilizado neste estudo.

Figura 13. Microfotografia de hemócitos, realizada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após coloração com 0.33% de vermelho neutro.



Legenda: Na figura A está representado um hemócito do tipo granulócito (corado de vermelho). Na figura B está representado um hemócito do tipo hialinócito (não corado).

Fonte: Autor.

Tabela 8. Contagem total e diferencial celular (média + desvio padrão) de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.

População de hemócitos (10^5 células por mL de hemolinfa)			
Grupo	Granulócitos	Hialinócitos	Total
Controle	$3,77 \pm 0,26$	$6,35 \pm 0,44$	$10,12 \pm 1,21$

Ensaio de atividade metabólica

Para realização do teste de atividade metabólica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, o ensaio proposto por Bezerra *et al.* (1997) e Pereira *et al.*, 2006, utilizado para avaliar a atividade fagocítica dos hemócitos *Biomphalaria tenagophila*, foram adaptados e utilizados neste estudo. Em resumo, este ensaio baseia-se no princípio da correlação entre a capacidade dos hemócitos de reduzirem o MTT em cristais de formazan (de cor azulado) dentro das células com a atividade metabólica. Assim, a intensidade de redução do MTT é proporcional as atividades metabólicas dos hemócitos.

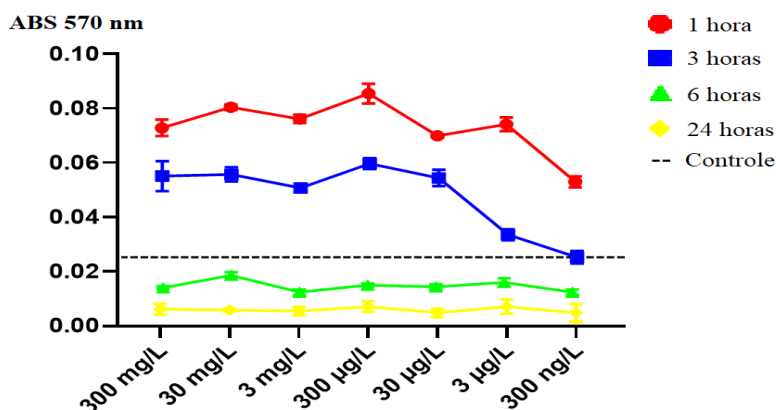
Neste ensaio, a mesma quantidade de células foi utilizada em todos os experimentos (1×10^5) para avaliar sua atividade metabólica após exposição ao TDF. Depois da exposição dos hemócitos ao resíduo farmacêutico por uma hora, foi adicionado o MTT nas amostras e em seguida vedadas e incubadas em banho maria a 28

°C por 1, 3, 6 e 24 horas, no escuro. A vedação é necessária para minimizar a evaporação e as chances de contaminação da amostra. Essa vedação deve ser feita com um material opaco, como papel alumínio, por exemplo, uma vez que o reagente utilizado é fotossensível. Após incubação, a solubilização do formazan foi testada utilizando 0,1N HCl-Isopropanol ou DMSO.

Tempo de exposição ao TDF

Para determinar o melhor tempo de incubação das células com TDF, todos grupos foram simultaneamente incubados em diferentes períodos de tempo com o Fumarato de Tenofovir Desoproxila. Como pode ser visto na Figura 14, houve um aumento da atividade metabólica dos hemócitos após 1 e 3 horas de exposição ao fármaco, enquanto 6 e 24 horas não foi observado aumento, quando comparado ao controle. Esses achados sugerem que a visualização dos efeitos da exposição do resíduo sobre os hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, é mais bem visualizada entre 1 e 3 horas de exposição ao TDF. Além disso, por não haver adição de antibióticos (penicilina ou estreptomicina) no meio CBSS, longos tempos de incubação (24 horas) favorecem o crescimento de bactérias, influenciando diretamente no resultado da análise. Essas bactérias naturalmente se encontram na amostra, uma vez que sua origem vem do próprio organismo do molusco.

Figura 14. Atividade metabólica (ensaio de MTT) de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos por diferentes tempos, in vitro. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata).



Legenda: A linha pontilhada (---) indica o valor médio da atividade fagocítica do grupo controle negativo, exposto ao CBSS. **Fonte:** Autor.

Tempo de incubação com MTT

Para determinar o melhor tempo de incubação das células com MTT, todos os grupos foram simultaneamente incubados por uma hora com Fumarato de Tenofovir Desoproxila em diferentes concentrações. Com o tempo de incubação das células com MTT por 3 e 6 horas (tabela 10 e 11, respectivamente), foi possível observar um aumento da atividade metabólica, resultado da conversão do MTT em formazan pelas células. Por outro lado, o tempo de incubação de 1 e 24 horas (tabela 9 e 12, respectivamente), resultou em uma drástica redução da atividade metabólica das células. O resultado da baixa atividade metabólica após uma hora de incubação ao MTT é resultado do tempo de incubação, insuficiente para as células converterem corretamente o MTT em formazan. O resultado após 24 horas, a baixa atividade metabólica é consequência do alto número de células mortas devido ao longo tempo de exposição.

Tabela 9. Atividade metabólica de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* incubados por uma hora com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por uma hora.

Grupo	0,1N HCl-Isopropanol	DMSO
Branco do solvente	0,143 ± 0,005	0,143 ± 0,003
Controle negativo	0,023 ± 0,004	0,018 ± 0,003
Controle positivo	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,001
TDF 300 mg/L	0,015 ± 0,002	0,013 ± 0,002
TDF 30 mg/L	0,021 ± 0,002	0,013 ± 0,002
TDF 3 mg/L	0,013 ± 0,004	0,012 ± 0,003
TDF 300 µg/L	0,015 ± 0,002	0,014 ± 0,005
TDF 30 µg/L	0,017 ± 0,003	0,012 ± 0,004
TDF 3 µg/L	0,017 ± 0,001	0,016 ± 0,002
TDF 300 ng/L	0,014 ± 0,002	0,014 ± 0,004

Legenda: TDF = Fumarato de Tenofovir Desoproxila; HCl = ácido clorídrico; DMSO = dimetilsulfóxido.

Tabela 10. Atividade metabólica de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* incubados por três horas com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por três horas.

Grupo	0,1N HCl-Isopropanol	DMSO
Branco do solvente	0,131 ± 0,009	0,142 ± 0,006
Controle negativo	0,024 ± 0,003	0,014 ± 0,002
Controle positivo	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001
TDF 300 mg/L	0,077 ± 0,004	0,014 ± 0,003
TDF 30 mg/L	0,081 ± 0,003	0,013 ± 0,004
TDF 3 mg/L	0,079 ± 0,001	0,015 ± 0,005
TDF 300 µg/L	0,086 ± 0,005	0,014 ± 0,003
TDF 30 µg/L	0,067 ± 0,004	0,011 ± 0,003
TDF 3 µg/L	0,077 ± 0,005	0,008 ± 0,002
TDF 300 ng/L	0,055 ± 0,003	0,012 ± 0,002

Legenda: TDF = Fumarato de Tenofovir Desoproxila; HCl = ácido clorídrico; DMSO = dimetilsulfóxido.

Tabela 11. Atividade metabólica de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* incubados por seis horas com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por seis horas.

Grupo	0,1N HCl-Isopropanol	DMSO
Branco do solvente	0,126 ± 0,004	0,131 ± 0,003
Controle negativo	0,014 ± 0,002	0,009 ± 0,002
Controle positivo	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
TDF 300 mg/L	0,057 ± 0,004	0,012 ± 0,002
TDF 30 mg/L	0,050 ± 0,001	0,014 ± 0,005
TDF 3 mg/L	0,050 ± 0,002	0,011 ± 0,002
TDF 300 µg/L	0,056 ± 0,005	0,010 ± 0,001
TDF 30 µg/L	0,052 ± 0,002	0,014 ± 0,002
TDF 3 µg/L	0,074 ± 0,003	0,021 ± 0,003
TDF 300 ng/L	0,051 ± 0,002	0,009 ± 0,002

Legenda: TDF = Fumarato de Tenofovir Desoproxila; HCl = ácido clorídrico; DMSO = dimetilsulfóxido.

Tabela 12. Atividade metabólica de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* incubados por 24 horas com MTT. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorbância (570 nm) em média e desvio padrão de três ensaios (triplicata), após exposição ao TDF por 24 horas.

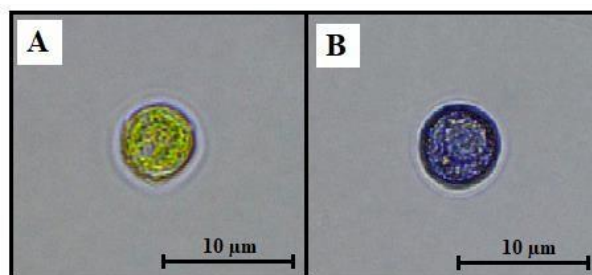
Grupo	0,1N HCl-Isopropanol	DMSO
Branco do solvente	0,143 ± 0,004	0,141 ± 0,005
Controle negativo	0,022 ± 0,004	0,020 ± 0,005
Controle positivo	0,003 ± 0,002	0,002 ± 0,001
TDF 300 mg/L	0,015 ± 0,002	0,016 ± 0,004
TDF 30 mg/L	0,017 ± 0,003	0,014 ± 0,002
TDF 3 mg/L	0,015 ± 0,003	0,014 ± 0,004
TDF 300 µg/L	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,003
TDF 30 µg/L	0,016 ± 0,004	0,011 ± 0,004
TDF 3 µg/L	0,016 ± 0,002	0,015 ± 0,003
TDF 300 ng/L	0,015 ± 0,003	0,014 ± 0,003

Legenda: TDF = Fumarato de Tenofovir Desoproxila; HCl = ácido clorídrico; DMSO = dimetilsulfóxido.

Solubilização do Formazan

Para determinar a melhor forma de solubilização do formazan, uma réplica foi adicionada em todos os grupos para solubilizar em 0,1N HCl-Isopropanol ou DMSO. Observou-se que a solução de ácido clorídrico 0,1N em isopropanol foi mais eficiente na solubilização dos cristais de formazan do que quando comparado ao DMSO. Mesmo agitando e centrifugando a amostra com DMSO, parte do formazan ainda se encontrava no interior da célula e conseqüentemente, refletindo na atividade metabólica, a qual foi menor quando comparado ao ácido clorídrico 0,1N em isopropanol (Figura 15).

Figura 15. Microfotografia de hemócitos, tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após 3 horas de incubação com MTT e solubilização com DMSO.

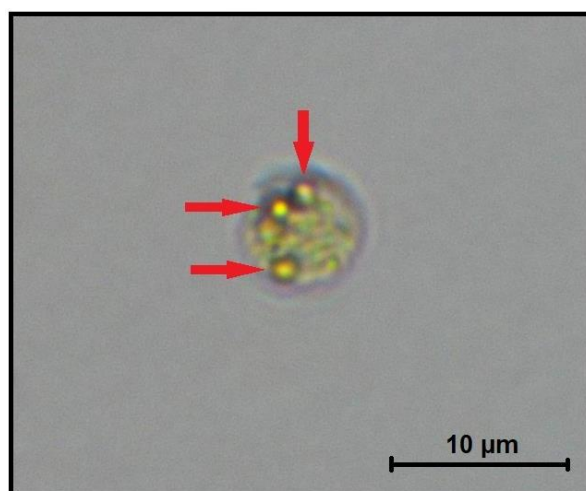


Legenda: Na figura A está representado um hemócito sem formazan no interior da célula (coloração amarela). Na figura B está representado um hemócito com formação de formazan em seu interior (coloração azul/violeta). **Fonte:** Autor.

Análise do índice de fagocitose celular

Para este ensaio, a variável tempo foi avaliada com o objetivo de estabelecer a melhor hora para avaliação da atividade fagocítica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Figura 16). Para isso, 1×10^5 células foram incubadas primeiramente com TDF por 1 hora e em seguida adicionadas 1×10^6 micropartículas na amostra (1:10) e incubadas novamente por 1, 3 e 24 horas a 28 °C em banho maria. Após incubação, 100 µL de cada amostra foram transferidos para lâminas de microscopia, as quais ficaram em câmara úmida por 60 minutos. Levando em consideração a capacidade de adesão dos hemócitos (principalmente os do tipo granulócitos), após incubação em câmara úmida, cada lâmina deve ser lavada com CBSS para retirar excessos de micropartículas e células não aderidas. Esse processo de lavagem é essencial para garantir uma boa interpretação do resultado, visto que o excesso de micropartículas que fica na amostra pode interferir no resultado da análise.

Figura 16. Microfotografia de hemócito do tipo granulócito de *Biomphalaria glabrata*, tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após uma hora de incubação com TDF 300 mg/L e uma hora de incubação com micropartículas de dióxido de silício.



Legenda: As setas vermelhas presentes na figura indicam a presença intracelular de micropartículas. **Fonte:** Autor.

A utilização de micropartículas de dióxido de silício contribui para avaliar o efeito do resíduo de TDF sobre os hemócitos. Algumas outras partículas podem ser utilizadas neste ensaio, como Zymosan, contudo essas partículas acabam induzindo um aumento da atividade celular dos hemócitos (Bezerra *et al.*, 1999), dificultando a visualização do efeito do resíduo, que muitas vezes é pequeno.

Por isso, por meio dos resultados obtidos (Tabelas 13, 14 e 15) foi possível observar que 1 hora de incubação com as micropartículas é o suficiente para avaliar a atividade fagocítica. Esse tempo de incubação leva em consideração dois fatores: (i) a capacidade limitada do meio (CBSS) de manter as células viáveis, por isso longos intervalos de tempo não é viável para este experimento; e (ii) a toxicidade do TDF, como visto anteriormente, longos períodos de incubação com fármaco, principalmente em altas concentrações, reduz a viabilidade das células.

Tabela 13. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, após uma hora de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

População de hemócitos circulantes (10^5 por mL de hemolinfa)			
Grupo	Índice de fagocitose	Micropartículas por célula	Total de micropartículas intracelulares
Controle (-)	27,87 ± 1,54	0,73 ± 0,04	73,33 ± 4,04
TDF 300 mg/L	47,63 ± 2,59	1,25 ± 0,07	125,33 ± 6,81
TDF 30 mg/L	46,49 ± 4,37	1,22 ± 0,12	122,33 ± 11,50
TDF 3 mg/L	39,14 ± 2,12	1,03 ± 0,06	103,00 ± 5,57
TDF 300 µg/L	52,31 ± 2,30	1,81 ± 0,05	95,06 ± 4,50
TDF 30 µg/L	35,72 ± 2,37	0,94 ± 0,06	94,00 ± 6,24
TDF 3 µg/L	26,60 ± 1,52	0,70 ± 0,04	70,00 ± 4,00
TDF 300 ng/L	26,73 ± 2,70	0,70 ± 0,07	70,33 ± 7,09

Tabela 14. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, após três horas de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

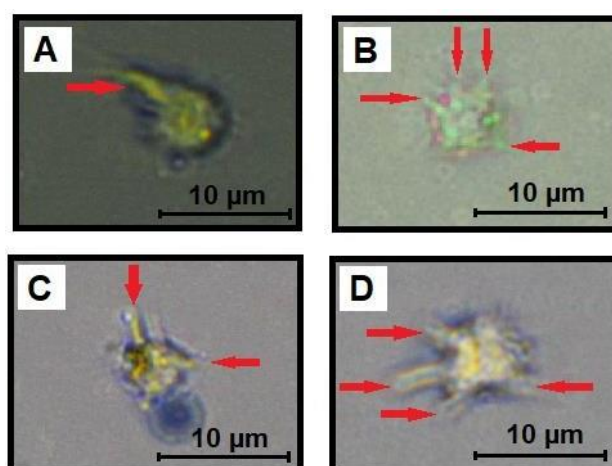
População de hemócitos circulantes (10^5 por mL de hemolinfa)			
Grupo	Índice de fagocitose	Micropartículas por célula	Total de micropartículas intracelulares
Controle (-)	26,60 ± 0,76	0,70 ± 0,02	70,00 ± 2,00
TDF 300 mg/L	41,17 ± 2,29	1,08 ± 0,06	108,33 ± 6,03
TDF 30 mg/L	43,57 ± 3,16	1,15 ± 0,08	11,67 ± 8,33
TDF 3 mg/L	36,26 ± 2,32	0,95 ± 0,06	95,33 ± 6,11
TDF 300 µg/L	29,13 ± 12,16	0,77 ± 0,32	76,67 ± 32,01
TDF 30 µg/L	32,81 ± 1,80	0,86 ± 0,05	86,33 ± 4,73
TDF 3 µg/L	26,35 ± 1,87	0,69 ± 0,05	69,33 ± 4,93
TDF 300 ng/L	25,84 ± 2,31	0,68 ± 0,06	68,00 ± 6,08

Tabela 15. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, após vinte e quatro horas de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

População de hemócitos circulantes (10^5 por mL de hemolinfa)			
Grupo	Índice de fagocitose	Micropartículas por célula	Total de micropartículas intracelulares
Controle (-)	4,94 ± 1,01	0,13 ± 0,03	13,00 ± 2,65
TDF 300 mg/L	60,8 ± 1,01	0,16 ± 0,03	16,00 ± 2,65
TDF 30 mg/L	5,32 ± 1,01	0,14 ± 0,03	14,00 ± 2,65
TDF 3 mg/L	5,70 ± 1,37	0,15 ± 0,04	15,00 ± 3,61
TDF 300 µg/L	5,95 ± 0,79	0,16 ± 0,02	15,67 ± 2,08
TDF 30 µg/L	6,08 ± 1,14	0,16 ± 0,03	16,00 ± 3,00
TDF 3 µg/L	5,95 ± 0,79	0,16 ± 0,02	15,67 ± 2,08
TDF 300 ng/L	5,07 ± 0,22	0,13 ± 0,01	13,33 ± 0,58

A análise do índice de fagocitose dos hemócitos após exposição ao TDF demonstrou um aumento considerável da quantidade de micropartículas fagocitadas pelos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, em relação ao controle negativo. Assim, pode-se dizer que o resíduo farmacêutico TDF foi capaz de estimular as células e aumentar sua atividade fagocítica. Contudo, esse estímulo é limitado, reduzindo ao longo do tempo de exposição. Após algumas horas, ocorre uma inibição da atividade fagocítica dos hemócitos. Apenas durante a primeira hora de exposição, foi possível observar a presença de filopódios nos hemócitos (Figura 17).

Figura 17. Microfotografia de hemócito do tipo granulócito de *Biomphalaria glabrata*, tirada em microscópio óptico com ampliação de 400x, após uma hora de incubação com TDF.



Legenda: A Figura A é o grupo controle, exposto apenas ao CBSS. A Figura B, C e D são as células expostas nas concentrações 300 mg/L, 30 mg/L e 3 mg/L, respectivamente. As setas vermelhas presentes na figura indicam a presença filopódios emitidos pelos hemócitos. **Fonte:** Autor.

Assim como para os demais ensaios, para avaliar a taxa de fagocitose dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, as células foram incubadas por uma hora com o fármaco e em seguida incubadas por mais uma hora com as micropartículas. A lavagem das lâminas após incubação na câmara húmida por uma hora é crucial para produção de bons resultados, visto que o excesso de micropartículas pode influenciar no resultado da análise.

CONCLUSÃO

Para obter bons resultados, não basta apenas um bom delineamento do experimento *in vitro*. O bem-estar físico e biológico do molusco é essencial para obter esses resultados e para isso, a suplementação e alimentação do molusco deve ser realizada corretamente. Aqui discutimos os principais pontos que influenciam no desenvolvimento do molusco e que devem ser levados em consideração durante um ensaio de citotoxicidade utilizando *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico. Além dos cuidados com os moluscos, a manutenção e controle da qualidade da água do aquário de criação também devem ser respeitados. Estes testes requerem a padronização de diversos parâmetros, incluindo a dureza da água, que também pode influenciar no desenvolvimento do molusco, como no efeito da toxicidade no ensaio.

Neste estudo demonstramos a importância de se avaliar as opções disponíveis para o ensaio, desde o meio de cultura até os diferentes tempos de exposição dos hemócitos ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila. A obtenção dos hemócitos seguida pela avaliação da viabilidade e diferenciação celular auxilia na obtenção dos resultados da atividade metabólica e fagocítica. Durante a exposição dos hemócitos ao TDF, observamos que o tempo de exposição de 1 hora é suficiente para visualizar o efeito do resíduo farmacêutico sobre os hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. Além disso, observamos que o meio CBSS preparado não é capaz de suprir as necessidades das células, sendo um dos motivos do aumento de células inviáveis.

Mesmo com bons resultados no tempo de exposição ao resíduo por 6 horas, esse tempo de exposição não é recomendado, pois em seguida outras incubações (ensaio de atividade metabólica e fagocitose) irão correr, prolongando ainda mais o tempo de exposição dos hemócitos ao fármaco. Desta forma, a somatória total dos tempos de incubação do fármaco e do ensaio não deve ultrapassar as 6 horas e devem ser realizados em tubos de vidro siliconizados. O tempo de incubação ideal com MTT foi de 3 horas, sendo que a solução de ácido clorídrico 0,1 N diluído em isopropanol, apresentou melhores resultados quando comparados ao DMSO, para solubilização do formazan formado a partir da metabolização do MTT pelos hemócitos.

A partir dessa padronização do ensaio, foi possível estabelecer os melhores tempos de incubação com o fármaco, o tempo de incubação com as micropartículas e com o corante MTT. Além disso, confirmamos qual o melhor meio para exposição das células,

em tubos de vidro siliconizado, para ensaios de citotoxicidade em estudos de ecotoxicologia. Esse estudo irá contribuir para futuros estudos de ecotoxicidade, utilizando hemócitos de *Biomphalaria glabrata* como biomarcador. Destacamos também a necessidade de realização de mais estudos para avaliar outros biomarcadores, como os embriões, como também outros ensaios, ensaio cometa, bioacumulação e entre outros.

REFERÊNCIAS

ABÍLIO, F.J.P; RUFFO, T.L.M; SOUZA, A.H.F.F; JUNIOR, E.T.O; MEIRELES, B.N; SANTANA, A.C.D. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecologia Brasiliensis**. v. 11, p. 397-409, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2007.1103.09>

ALBERTO-SILVA, A.C. et al. Behavioral response of *Biomphalaria glabrata* exposed to a sublethal concentration of *Euphorbia milii* latex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências [online]**. v. 92, n. 1, p. e20190298, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020190298>.

ANDRADE, R.M; MARUCH, S.M; COSTA, M.J. Alimentação e fecundidade de planorbídeos criados em laboratório: IV - *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879). (pulmonata, planorbidae). **Rev Saúde Públ.** v. 12, p. 90-98, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101978000100010>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>.

BAIRD, R., BRIDGEWATER, L. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd edition. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2017. Disponível em: <https://www.standardmethods.org/>.

BARBOSA, N.D; PIMENTEL-SOUZA, F; SAMPAIO, I.B. The effect of seasonal temperature and experimental illumination on reproductive rate in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 20, p. 685–696, 1987.

BAYNES, A; MONTAGUT PINO, G; DUONG, G.H; LOCKYER, A.E; MCDOUGALL, C; JOBLING, S; ROUTLEDGE, E.J. Early embryonic exposure of freshwater gastropods to pharmaceutical 5-alpha-reductase inhibitors results in a surprising open-coiled “banana-shaped” shell. **Sci. Rep.** v. 9, p. 1–12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52850-x>.

BEZERRA, F. S.M; NOGUEIRA-MACHADO, A.J; CHAVES, M.M; et al. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

[online]. v. 39, n. 4, p. 197-202, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000400003>.

BEZERRA, F.S; COELHO, P.M; CHAVES, M.M; MARTINS, R.L; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Comparative study on the effect of cyclic nucleotides related to the function of *Biomphalaria glabrata* hemocytes and human granulocytes. **Acta Trop.** v. 72, n. 3, p. 275-80, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(99)00004-2).

BORGHT, O.V.D. & PUymbroEck, S.V. Calcium metabolism in a freshwater mollusk: quantitative importance of water and food as supply for calcium during growth. **Nature**, v. 210, n. 5038, p. 791-793, 1966. DOI: <https://doi.org/10.1038/210791a0>.

CAIXETA, M.B; ARAÚJO, P.S; PEREIRA, A.C; et al. *Biomphalaria* embryotoxicity test (BET): 60 years of research crossing boundaries for developing standard protocols. **Sci Total Environ.** v. 833, p. 155211, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155211>.

CHERNIN, E. Studies on the control of schistosome-bearing snails. VII. Streptomycin-induced inhibition of growth and reproduction in the schistosome-bearing snail, *Australorbis glabratus*. **Am. J. Hyg.** v. 66, p. 321-330, 1957. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119905>.

CHERNIN, E. Observations on Hearts Explanted In Vitro from the Snail *Australorbis Glabratus*. **The Journal of Parasitology**, v. 49, n. 3, p. 353–64, 1964. DOI: <https://doi.org/10.2307/3275797>.

CHIEFFI, P.P. Influência do tipo de alimentação sobre o crescimento, maturação sexual, sobrevivência e oviposição de *Biomphalaria glabrata* (molusca, planorbidae). **Rev Patol Trop.** v. 4, p. 91-99, 1975. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v4i2.22462>.

de CHRISTOFORO, R; PENZAK, S.R. Tenofovir: a nucleotide analogue reversetranscriptase inhibitor for treatment of HIV infection. **American Journal of Healthsystem Pharmacy.**, v. 61, n. 1, p. 86-98, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajhp/61.1.86>.

DEAN, P; RICHARDS, E.H; EDWARDS, J.P., et al. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Dev. Comp. Immunol.** v. 28, p. 689–700, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.11.006>.

DRUART, C; SCHEIFLER, R; MILLET, M; DE VAUFLEURY, A. Land snail eggs bioassays: a new tool to assess embryotoxicity of contaminants in the solid, liquid or gaseous phase of soil. **Appl. Soil Ecol.** v. 53, p. 56–64, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.006>.

EVELAND, L.K. & HASEEB, M.A. Laboratory Rearing of Biomphalaria glabrata Snails and Maintenance of Larval Schistosomes in vivo and in vitro. In: Toledo R, Fried B (org.). Biomphalaria Snails and Larval Trematodes. **Springer: Switzerland**, p. 33-55, 2010. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7028-2_2.

EVELAND, L.K. & RITCHIE, L.S. Infectivity of cercariae of Schistosoma mansoni from snails on inadequate diets. **Parasitology.** v. 64, p. 441–444, 1972. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0031182000045509>

FRYER, S.E. & BAYNE, C.J. Phagocytosis of latex beads by Biomphalaria glabrata hemocytes is modulated in a strain-specific manner by absorbed plasma components. **Dev Comp Immunol**, v. 20, p. 323 – 337, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(95\)00039-V](https://doi.org/10.1016/0145-305X(95)00039-V).

GARATE, O.F; GAZZANIGA, S; COCHÓN A.C. A comparative study of enzymatic and immunological parameters in Planorbarius corneus and Biomphalaria glabrata exposed to the organophosphate chlorpyrifos. **Aquat. Toxicol.**, v. 225, p. 105544, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105544>.

HILLYER, J.F. et al. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (Aedes aegypti) correlates with a decrease in haemocyte numbers. **Microbiol celular.** v. 7, p. 39-51, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00430.x>

KALINDA, C; CHIMBARI, M; MUKARATIRWA, S. Implications of changing temperatures on the growth, fecundity and survival of intermediate host snails of schistosomiasis: a systematic review. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** v. 14, p. 80, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph14010080>.

KAUR, S; BAYNES, A; LOCKYER, A.E; ROUTLEDGE, E.J; JONES, C.S; NOBLE, L.R; JOBLING, S. Steroid androgen exposure during development has no effect on reproductive physiology of Biomphalaria glabrata. **PLoS One.** v. 11, p. 1–22, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159852>.

LEE, F.O., CHENG, T.C. Schistosoma mansoni: Alterations in total protein and hemoglobin in the hemolymph of infected Biomphalaria glabrata. **Experimental Parasitology**. v. 31, p. 203-216, 1972. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(72\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(72)90111-7).

LEWIS, F.A.; PATTERSON, C.N; KNIGHT, M; RICHARDS, C.S. The relationship between Schistosoma mansoni and Biomphalaria glabrata: genetic and molecular approaches. **Parasitology**. v. 123, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0031182001007831>.

LIMA, M.V; SIQUEIRA, W.N; SILVA, H.A.M.F; et al. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of Biomphalaria glabrata. **Environ Sci Pollut Res Int**. v. 26, n. 4, p. 3350-3356, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3848-3>.

LOWE, D.M. & PIPE R.K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. **Aquat Toxicol**, v. 30, p. 357-365, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00045-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00045-X).

MARTINS-SOUZA, R.L; PEREIRA, C.A.J; COELHO, P.M.Z; ANDRADE, Z.A; NEGRAO-CORREA, D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of Biomphalaria tenagophila to Schistosoma mansoni infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitol. Res**. v. 91, p. 500–507, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0985-4>.

MCCREESH, N; ARINAITWE, M; ARINEITWE, W; TUKAHEBWA, E.M; BOOTH, M. Effect of water temperature and population density on the population dynamics of Schistosoma mansoni intermediate host snails. **Parasit. Vectors**. v. 7, n. 503, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0503-9>.

MELO, A.O; DOS SANTOS, D.B; SILVA, L.D; ROCHA, T.L; BEZERRA, J.C.B. Molluscicidal activity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride on the early-life stages and adults of the Biomphalaria glabrata (Say, 1818). **Chemosphere**. v. 216, p. 365–371, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.035>.

MELO, E.S; BRAYNER, F.A; JUNIOR, N.C.P; et al. Investigation of defense response and immune priming in Biomphalaria glabrata and Biomphalaria straminea, two species with different susceptibility to Schistosoma mansoni. **Parasitol Res**. v. 119, p. 189–201, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06495-4>.

MÜNZINGER, M.L., GUARDUCCI. The effect of low zinc concentrations on some demographic parameters of *Biomphalaria glabrata* (Say), mollusca: gastropoda. **Aquat. Toxicol.**, v. 12, p. 51 – 61, 1988. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90019-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90019-7).

MONA, M.H; GAAFAR, R.G; HELAL, I.B; et al. Evaluation of cytotoxic effects of atrazine and glyphosate herbicides on *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, n. 2, p. 68 – 75, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.05.004>.

OLIVEIRA-FILHO, E.C; et al. Implications of water hardness in ecotoxicological assessments for water quality regulatory purposes: a case study with the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Brazilian Journal of Biology [online]**. v. 74, n. 1, p. 175-180, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.24212>.

OLIVEIRA-FILHO, E.C; MUNIZ, D.H.F; CARVALHO, E.L; et al. Effects of AgNPs on the Snail *Biomphalaria glabrata*: Survival, Reproduction and Silver Accumulation. **Toxics.**, v. 7, n. 1, p. 12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics7010012>

O'SULLIVAN, C; FRIED, B; SHERMA, J. Studies on the pH tolerance of *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 16, p. 21 – 23, 2012.

PAZ, W.S; RAMOS, W.S.R GOMES, D.S; et al. Influence of food type and calcium supplementation on growth, oviposition and survival parameters of *Biomphalaria glabrata* AND *Biomphalaria straminea*. **Journal of Tropical Pathology**, v. 49, n. 1, p. 21–31, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v49i1.62089>

PELLEGRINO, J., KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. In: **Advances in Parasitology** (D. Ben, ed.), p. 233-290, 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60475-3](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60475-3).

PEREIRA, C.A; MARTINS-SOUZA, R.L; COELHO, P.M; et al. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, v. 98, n. 3, p. 224 – 33, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.002>.

PORTET, A; GALINIER, R; LASSALLE, D; FAILLE, A; GOURBAL, B; DUVAL, D. Hemocyte siRNA uptake is increased by 5' cholesterol-TEG addition in *Biomphalaria*

glabrata, snail vector of schistosome. **Peer J.** v. 9, p. e10895, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.7717/peerj.10895>

ROSA, F.M; MARQUES, D.P.A; MACIEL, E. et al. Breeding of *Biomphalaria tenagophila* in mass scale. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** v. 55, p. 39-44, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000100007>.

SAMSI, A.N; ASAF, R; SAHABUDDIN, S.A; WAMNEBO, M.I. Gastropods as abioindicator and biomonitoring metal pollution. **Aquac. Indones.** v. 18, p. 1–8, 2017.

DOI: <http://doi.org/10.21534/ai.v18i1.42>.

SIQUEIRA, W.N; FRANÇA, E.J; PEREIRA, D.R; et al. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere.** v. 249, p. 126218, 2020. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126218>

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Curr Protoc Immunol.** v. 2, n. 111, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.

SUBBA, M; KEOUGH, M.J; KELLAR, C; LONG, S; MIRANDA, A; PETTIGROVE, V.J. *Potamopyrgus antipodarum* has the potential to detect effects from various land use activities on a fresh-water ecosystem. **Environ. Pollut.** p. 117563, 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117563>.

TALLARICO, L.F. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. **Amer Malac Bull.** v. 33, p. 1-7, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.4003/006.033.0220>.

THOMAS, J.D; LOUGH, A; ARAM, R.H. The effects of calcium in the external environment on the growth and natality rates of *Biomphalaria glabrata* (Say). **J Anim Ecol.** v. 43, p. 839-860, 1974. DOI: <https://doi.org/10.2307/3281840>.

YANG, J.E; KIM, J.J; SKOGLEY, E.O; SCHAFF B.E. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. **Soil Science Society of America Journal,** v. 62, n. 4, p. 1108-1115, 1998. DOI:

<https://doi.org/10.2136/sssaj1998.03615995006200040036x>.

CAPÍTULO 4: Avaliação ecotoxicológica do antirretroviral Fumarato de Tenofovir Desoproxila sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* e seus hemócitos.

RESUMO

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) é um fármaco, comprovadamente, presente no meio ambiente. No entanto, poucas informações sobre seu impacto ambiental estão disponíveis na literatura científica. Deste modo, o objetivo com esse trabalho foi avaliar os potenciais efeitos ecotoxicológicos do TDF sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* e seus hemócitos. Para a análise *in vitro*, os hemócitos foram expostos a diferentes concentrações do fármaco por uma hora e avaliados quanto a viabilidade, atividade fagocítica e metabólica. A análise *in vivo* consistiu na exposição de grupos de cinco moluscos, em triplicata, nas mesmas concentrações por 72 horas e 21 dias, avaliando a mortalidade, comportamento do molusco e hemolinfa. As exposições do molusco ao TDF nas concentrações testadas não provocaram redução de sua sobrevivência, apenas mudanças comportamentais. Por outro lado, quando sua hemolinfa foi avaliada, observou-se uma toxicidade do TDF para os hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, sendo capaz de estimular a atividade metabólica, fagocítica e reduzir sua viabilidade, similar aos resultados *in vitro*. A partir destes resultados, foi possível avaliar os impactos causados pela exposição do fármaco *in vitro* e *in vivo*, em uma perspectiva complementar aos testes de embriotoxicidade com o molusco. Mesmo que aparentemente haja toxicidade sobre o molusco e seus hemócitos, mais estudos devem ser realizados para contribuir com o entendimento dos efeitos desse resíduo no meio ambiente. Isto porque, de acordo com o GHS, os resultados obtidos para ecossistemas aquáticos foram classificados como tóxicos, capazes de causar efeitos nocivos em concentrações abaixo de 10 mg/L.

Palavras-chave: Fumarato de Tenofovir Desoproxila; *Biomphalaria glabrata*; Hemócitos;

INTRODUÇÃO

Desde 2001, o Fumarato de Tenofovir desoproxila (TDF) é utilizado, mundialmente, para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), com uma dosagem diária de 300 mg por via oral (Masho et al., 2007). Seu mecanismo de ação consiste em bloquear a transcriptase reversa, enzima necessária para a produção viral, permitindo o gerenciamento da carga viral do HIV por meio da diminuição de sua replicação (Murphy & Valentovic, 2017). Além disso, TDF apresenta elevada eficácia na redução da carga viral (Meintjes *et al.*, 2017) sendo um dos poucos fármacos que desempenha atividade anti HIV-1, comumente encontrado pelo mundo, e HIV-2, encontrado na África Ocidental (Kearney *et al.*, 2004; Andreatta *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2015).

O fármaco TDF é uma molécula polar que apresenta baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral e uma grande resistência a metabolização por sistemas biológicos (Geboers *et al.*, 2015; Moss *et al.*, 2017). Desta forma, cerca de até 80% da dose do medicamento absorvida pelo usuário pode ser eliminada pela urina na forma inalterada dentro de 72 horas após sua administração (Kearney *et al.*, 2004; Murphy & Valentovic, 2017).

Desta forma, diversos fármacos, como o TDF são diariamente eliminados para o meio ambiente por meio das excreções humanas, como fezes e/ou urina, permitindo que os resíduos desses fármacos alcancem o meio ambiente por meio do esgoto urbano e/ou hospitalar (Mahmood *et al.*, 2019). Outro agravo ambiental provocado pela eliminação desses resíduos nas redes de esgoto, é a ineficiência das estações de tratamento de eliminarem totalmente esse resíduo. (Badawy *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2015).

Por este motivo, o monitoramento de resíduos farmacêuticos nos efluentes de água deve ser priorizado, pois seus efeitos sobre organismos aquáticos não são completamente conhecidos (Silva *et al.*, 2019). Na África, foram detectadas concentrações entre 145 – 243 ng/L de Tenofovir em corpos de água, comprovando a necessidade de desenvolver métodos aprimorados para detectar resíduos farmacêuticos e avaliar sua toxicidade no meio aquático (Wood *et al.*, 2015).

Uma forma de avaliar o impacto ambiental causado por resíduos farmacêuticos é a realização de ensaios ecotoxicológicos de indivíduos ou células teste, os quais são expostos a uma determinada substâncias (Costa *et al.*, 2008). No geral, esses testes são

rápidos e de baixo custo, tornando-se importantes para avaliar os efeitos nocivos das atividades humanas, sobre o meio ambiente. Desta forma, estes testes tentam simular as condições ambientais em laboratório, ajudando assim a analisar e interpretar os resultados obtidos. Porém, a total simulação da complexidade do ecossistema aquático, continua sendo um desafio (Costa *et al.*, 2008).

Contudo, mesmo com a utilização de vários organismos nos ensaios ecotoxicológicos, a ampliação de modelos biológicos em diferentes níveis tróficos, utilizados nesses ensaios, torna-se necessária a fim de aproximar a simulação laboratorial do ecossistema. Assim, a implementação de um modelo biológico, como *Biomphalaria glabrata*, que possui todas as características necessárias para realização desses ensaios ecotoxicológicos, contribuirá diretamente para alcançar esse objetivo (Barbosa & Barbosa, 1994; Tallarico, 2016).

Dentre as inúmeras características que favorecem sua utilização como modelo biológico teste, destacam-se o baixo custo de criação e manutenção, alta reprodutividade, sensibilidade a alterações do meio, relevância clínica, capacidade de desempenhar resposta frente a substâncias solúveis e insolúveis em água além de possuir período embrionário rápido e bem descrito. Por isso, os moluscos dessa espécie vêm sendo utilizados como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos, mas sem explorar completamente todo seu potencial (Oliveira-Filho *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2019; Siqueira *et al.*, 2020).

Outro ponto forte para sua utilização como modelo biológico é o conhecimento sobre o seu sistema imunológico o qual é capaz de desenvolver respostas celulares e humorais inatas frente a patógenos invasores, respondendo a todo tipo de agressão (Rowley & Powell, 2007). Mesmo com algumas diferenças, sabe-se que existem muitas semelhanças entre a resposta de defesa inata dos invertebrados com o sistema de defesa interno dos vertebrados (Hoffmann, 2003).

Seu sistema interno de defesa é composto principalmente pelos hemócitos presentes na hemolinfa (Van Der Knaap & Loker, 1990; Sokolova, 2009) capazes de reconhecer e destruir patógenos por meio de uma resposta de encapsulação celular (Helal *et al.*, 2014; Abaza *et al.*, 2016). Os hemócitos possuem morfologia variável, podem ser divididos em subpopulações que apresentam diferentes respostas de defesa (Cavalcanti *et*

al., 2012), sendo compostos, principalmente, por duas populações celulares: hialinócitos e granulócitos (LoVerde *et al.*, 1982).

Levando em considerações essas vantagens na utilização do *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico, somada ao conhecimento de que os resíduos farmacêuticos representam risco para incontáveis espécies, principalmente do meio aquático. No presente estudo teve-se como objetivo avaliar os potenciais efeitos ecotoxicológicos do Fumarato de Tenofovir Desoproxila sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* e seus hemócitos a fim de entender melhor os efeitos desse fármaco no meio ambiente aquático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Biomphalaria glabrata

Foram utilizados moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* linhagem Belo Horizonte, obtidos na Lagoa da Pampulha (WGS84 19°51'09" S; 43°58'42" O) e mantidos por sucessivas gerações no Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os moluscos foram mantidos e criados em caixas de água (0,75 x 0,75 x 0,65 m), com volume de 200 litros de água filtrada, livre de cloro, pH $7,1 \pm 0,1$ a uma temperatura de 25 ± 2 °C, com limpeza e renovação semanal da água do aquário. Todos os moluscos mantidos sobre criação são alimentados, diariamente, com *Lactuca sativa* livre de pesticida e higienizado com solução de ácido acético (CH₃COOH) a 0,005%, *ad libitum*. Uma vez por semana, a alimentação dos moluscos era suplementada pela fórmula de Pellegrino e Katz (1968) com cerca de 200 mg de carbonato de cálcio (CaCO₃) por molusco.

Análises da água do aquário de criação

Antes da realização dos experimentos, amostras de água do aquário de criação dos moluscos eram coletadas e avaliadas quanto às propriedades físico-químicas e microbiológicas. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: alcalinidade, dureza total, dureza de cálcio, dureza de magnésio, pH, cloro residual livre e nitrato. Quando aos parâmetros microbiológicos da água, avaliou-se a presença ou ausência de coliformes totais e *Escherichia coli*.

Fumarato de Tenofovir Desoproxila

O Fumarato de Tenofovir Desoproxila (TDF) foi gentilmente doado pela Fundação Ezequiel Dias (Funed), por meio da Diretoria Industrial (DI), com emissão de certificado com avaliação completa para sua identificação e caracterização. Para os ensaios, o princípio ativo do antirretroviral foi solubilizado em solução salina balanceada de Chernin (47,7 mM de NaCl, 2,0 mM de KCl, 0,49 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de MgSO₄.7H₂O, 3,6 mM de CaCl₂.2H₂O, 0,59 mM de NaHCO₃, 5,5 mM de glicose, pH 7,2) (*in vitro*) ou água purificada (*in vivo*) na concentração de 3,0 g/L e em seguida, filtrado e diluído para a obtenção das concentrações, 300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 µg/L, 30 µg/L, 3 µg/L e 300 ng/L.

Exposição in vivo

Moluscos adultos com tamanho médio de 12 ± 2 mm foram expostos a cada concentração de TDF (300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 µg/L, 30 µg/L, 3 µg/L e 300 ng/L) em aquários de plástico de 500 mililitros contendo 250 mililitros da solução tratamento (5 moluscos por aquário; 50 mL por molusco), juntamente com um grupo controle negativo, mantido em água filtrada e sem cloro, e um grupo controle positivo, mantido em solução de 10% de metanol, durante 72 horas (exposição aguda) e 21 dias (exposição crônica). A exposição foi realizada em triplicata (5 moluscos por réplica, 15 moluscos por grupo experimental) em dois experimentos, em que o meio de exposição era trocado semanalmente para todos os grupos, incluindo os controles. Os moluscos foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*), *ad libitum*. Durante a exposição, os moluscos foram avaliados quanto a mortalidade e comportamento. Após exposição, os moluscos foram sacrificados e sua hemolinfa coletada para posterior avaliação de seus hemócitos quanto a concentração, viabilidade, atividade metabólica, fagocítica e produção de óxido nítrico, após exposição ao TDF.

Análise de sobrevivência e comportamento dos moluscos

A taxa de sobrevivência foi determinada, diariamente, durante o período de exposição de 72 horas e 21 dias, com observação a cada 12 horas. Essa taxa é dada pela razão entre o número de moluscos vivos sobre o número de moluscos do início da

exposição. Os critérios utilizados para classificação de morte dos moluscos foram: (i) presença do animal em decomposição no fundo do aquário e (ii) imobilidade. Diariamente os moluscos foram observados quanto a sua localização no aquário para determinar seu comportamento frente ao resíduo, sendo classificado como: estado de (i) repouso, molusco localizado no fundo do aquário; (ii) respiração, molusco localizado na superfície da água; e (iii) fuga, molusco localizado completamente fora d'água.

Obtenção dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*

Os moluscos foram selecionados do aquário de criação (análises *in vitro*) ou dos aquários de tratamento (análise *in vivo*). Foi utilizado álcool 70% borrifado em um pedaço de papel toalha para desinfetar a concha de cada molusco, em seguida, com auxílio de uma seringa (agulha 23G), a concha foi perfurada e a hemolinfa coletada por punção. Essa hemolinfa foi transferida, lentamente, para um tubo de vidro siliconizado com Sigmacote (Sigma-Aldrich - SL2), onde ficou sedimentando por 3 minutos para remoção de fragmentos de concha e/ou impurezas maiores. O sobrenadante foi recolhido e transferido para outro tubo siliconizado, que foi centrifugado a 700 rpm (80 G) durante 10 minutos a 4 °C (Sigma 4K15). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspendido com CBSS (pH 7,2), respeitando o volume original (Pereira *et al.*, 2006).

Exposição in vitro

Um total de $1,0 \times 10^5$ (250 μ L) hemócitos foram distribuídos em tubos de vidro siliconizado de 4 mL contendo 250 μ L de CBSS. Em seguida, os tubos foram separados, 5 tubos por grupo, e expostos por uma hora a 250 μ L de TDF ou CBSS (controle negativo) ou 10% metanol (controle positivo). Após a exposição, os hemócitos foram avaliados quanto a viabilidade, citotoxicidade e atividade fagocítica.

Análise de viabilidade

A análise de viabilidade e a contagem total de células foi realizada por meio do ensaio Azul de Tripán (Dean *et al.*, 2004). Para este propósito, os hemócitos tratados e os controles foram diluídos na proporção 1:10 em CBSS contendo 0,4% de Azul de Tripán

(Sigma-Aldrich - T8154). Para a diferenciação celular de granulócitos e hialinócitos, 10 μL da hemolinfa foram coletados de cada grupo e diluído em CBSS (1:10) contendo 0.33% de vermelho neutro (Sigma-Aldrich - N2889) (Martins-Souza *et al.*, 2003, Pereira *et al.*, 2006). Imediatamente após as colorações, as células coradas foram examinadas no microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), ampliação de 200 e 400x, com auxílio de uma Câmara de Neubauer (Global Optics – 7301-1B). Neste estudo, as células coradas em vermelho foram classificadas como granulócitos e as não coradas como hialinócitos (Bezerra *et al.*, 1997).

Teste do MTT

Para avaliação da atividade metabólica dos hemócitos, o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich - M2128), previamente descrito por Bezerra *et al.* (1997), foi utilizado com modificações. Após tratamento das células (1×10^5 hemócitos) foi distribuído em cada tubo de vidro 250 μL de CBSS e 20 μL de MTT (5 mg/mL), os quais ficaram incubados em banho maria a 28 $^{\circ}\text{C}$ por 3 horas, no escuro. Após incubação, foi adicionado 0,5 mL da solução de Ácido clorídrico 0,1N diluído em Isopropanol absoluto, para dissolver o formazan. Os tubos foram agitados com vórtex e centrifugados a 1.400 rpm (160 G) durante 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, 250 μL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de transferência de 96 poços, em triplicata. A leitura foi feita a 570 nm, em um leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC). O branco era composto por todos os reagentes envolvidos na análise, sem a presença de hemócitos (Pereira *et al.* 2006).

Mensuração do óxido nítrico na hemolinfa

Após exposição *in vivo*, a produção de óxido nítrico foi avaliada diretamente na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* pela reação de Greiss (Green *et al.*, 1982), que quantifica o conteúdo de nitrito dos sobrenadantes. Para isso, após exposição dos moluscos, 100 μL da hemolinfa foi coletada de cada grupo (tratamento e controle) e distribuída em triplicata na placa de 96 poços, adicionado 100 μL do reagente de Greiss (1% de Sulfanilamida, 0,1% de Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina e 5% de Ácido Fosfórico) e 100 μL do ácido tricloroacético (10%). Após 10 minutos, a

absorbância foi mensurada a 570 nm e a quantidade de nitrito em cada amostra foi estimada contra uma curva padrão de NaNO_2 , com nível de detecção de 0,15 nM (Pereira *et al.* 2006). O branco era composto por todos os reagentes envolvidos na análise, sem a presença de hemolinfa.

Análise do índice de fagocitose celular

A análise do índice de fagocitose dos hemócitos após exposição ao TDF foi determinada de acordo com Fryer e Bayne (1996), com modificações. Micropartículas de dióxido de silício de 1 μm de diâmetro (Sigma- Aldrich, 56798-5ML-F), foram adicionadas nos grupos basal e tratamento na proporção de dez micropartículas para cada hemócito (1:10). Em resumo, 1×10^6 beads (50 μL) foram adicionadas em cada tubo, contendo 1×10^5 (250 μL) hemócitos e incubadas por 1 hora a 28 °C em banho maria. Após a incubação, 100 μL de cada amostra foi transferido para lâminas de microscopia, as quais ficaram em câmara úmida por 60 minutos para adesão celular.

A fagocitose das micropartículas foi avaliada pela observação microscópica, na ampliação de 200 e 400x, de 100 células por meio do microscópio Nikon Eclipse E200 equipado com uma câmera digital e o software NIS Elements, versão 2.3. As imagens de 100 células por grupo, em triplicata, foram capturadas para obtenção do valor do índice de fagocitose. Esse índice se dá pela razão entre o número de hemócitos observados capazes de fagocitar as micropartículas administradas pelo número total de hemócitos registrados. Calculou-se um valor para cada grupo, basal e tratamento, para determinar a proporção de hemócitos envolvidos na fagocitose.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os softwares R (versão 4.2.1) e Prisma – GraphPad (versão 6.0). Inicialmente foi realizado um teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, os resultados obtidos em cada tratamento foram estatisticamente comparados com o grupo controle negativo, utilizando-se análise de variância para dados não paramétricos (Wilcoxon). Valores de $p < 0.05$ (ou seja, 95% de confiança) foram considerados como diferença estatisticamente significativos.

Os modelos log-logistic, log-normal e Weibull foram testados utilizando o drc do pacote de extensão para o software estatístico R (versão 3.4.2) para estimar a melhor função de montagem (Ritz *et al.*, 2015). Os modelos estatísticos de regressão dose-resposta representam a relação entre a variável independente (dose ou concentração) e a variável dependente (resposta ou efeito).

RESULTADOS

Qualidade da água do aquário de criação

Um total de sete amostras de água foram coletadas antes dos experimentos, *in vivo* e *in vitro*. Na tabela 16 estão apresentadas a média da análise dessas amostras.

Tabela 16. Avaliação da qualidade da água do aquário de criação dos moluscos *Biomphalaria glabrata* utilizada neste estudo.

Parâmetros	Unidade de medida	Resultado
Alcalinidade bicarbonato	mg/L de CaCO ₃	38,2 ± 4,8
Alcalinidade carbonato	mg/L de CaCO ₃	0,0 ± 0,0
Alcalinidade hidróxido	mg/L de CaCO ₃	0,0 ± 0,0
Cloro residual livre	mg/L	0,0 ± 0,0
Condutividade	µS/cm	112,8 ± 7,7
Dureza total	mg/L de CaCO ₃	150,6 ± 9,7
Dureza de cálcio	mg/L de Ca	46,0 ± 3,4
Dureza de magnésio	mg/L de Mg	2,4 ± 0,8
pH	-	7,1 ± 0,1
Nitrato	mg/L	0,6 ± 0,4
Coliformes totais	-	Positivo
<i>Escherichia coli</i>	-	Negativo

Análise de mortalidade e comportamento dos moluscos

Durante a exposição dos moluscos ao fármaco por 72 horas, não foi observado mortalidade em nenhum dos grupos do tratamento e controle negativo, apenas no controle positivo com mortalidade de 60% (n = 18). Por outro lado, durante o período de exposição crônica (21 dias), a taxa de mortalidade dos moluscos no grupo 300 mg/L, 300 µg/L e 3 µg/L foi maior, quando comparada ao grupo controle, mas sem diferença significativa (p > 0,05). Com a exposição do molusco ao TDF nas concentrações de 300 mg/L, 30 mg/L e 3 mg/L, foi observada uma diferença significativa (p < 0,05) quanto ao seu

comportamento durante a exposição, quando comparado ao controle. Esses moluscos se encontravam mais agitados que os demais, sendo a fuga d'água e repouso, os principais indicadores dessa característica. Para o grupo controle positivo, foi observado uma taxa de mortalidade de 100%. Os resultados da mortalidade e análise comportamental do molusco estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17. Mortalidade e análise comportamental de *Biomphalaria glabrata* (n = 30) expostos por 21 dias ao TDF.

Grupo	Mortalidade (%)	Repouso (n)	Respiração (n)	Fuga (n)
Controle (-)	6,6 ± 3,3	25,0 ± 2,5	3,8 ± 1,8	1,0 ± 1,2
TDF 300 mg/L	13,2 ± 6,6	16,9 ± 3,2*	3,4 ± 1,7	9,0 ± 3,1*
TDF 30 mg/L	9,9 ± 3,3	17,6 ± 2,3*	3,0 ± 1,4	9,3 ± 2,6*
TDF 3 mg/L	9,9 ± 3,3	19,9 ± 1,4*	3,2 ± 1,4	6,9 ± 1,4*
TDF 300 µg/L	13,2 ± 9,9	21,4 ± 2,0	4,4 ± 1,7	4,0 ± 1,9
TDF 30 µg/L	6,6 ± 3,3	22,8 ± 1,7	4,1 ± 1,6	3,0 ± 1,9
TDF 3 µg/L	13,2 ± 9,9	24,0 ± 1,0	3,4 ± 1,6	2,4 ± 1,8
TDF 300 ng/L	6,6 ± 3,3	23,6 ± 2,1	3,4 ± 2,5	2,9 ± 1,8

* indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (p < 0,05).

Contagem e viabilidade dos hemócitos

Durante a exposição *in vivo*, a quantidade total de hemócitos do *Biomphalaria glabrata*, em condições basais (controle negativo), foi de $125,8 \pm 3,2 \times 10^4$ e $127,3 \pm 3,6 \times 10^4$ hemócitos por mililitro de hemolinfa para exposição aguda (Tabela 18) e crônica (Tabela 19), respectivamente. Apenas exposição crônica a 300 mg/L de TDF resultou em uma queda estatisticamente significativa (p < 0,05) da população de hemócitos e sua viabilidade, quando comparadas ao grupo controle. Além disso, para essa mesma concentração, a razão entre os granulócitos e hialinócitos apresentou uma diferença significativa, indicando um possível efeito tóxico do TDF sobre os hemócitos de *Biomphalaria glabrata*. A contagem total de hemócitos circulantes na hemolinfa do grupo controle positivo não foi mensurada devido o total de mortalidade dos moluscos durante a exposição.

Tabela 18. Viabilidade e concentração total de hemócitos (média + desvio padrão) presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, após 72 horas de exposição.

População de hemócitos circulantes (10 ⁴ por mL de hemolinfa)				
Grupo	Células mortas	Granulócitos	Hialinócitos	Total
Controle (-)	7,0 ± 1,0	53,0 ± 2,0	72,8 ± 2,1	125,8 ± 3,2
TDF 300 mg/L	6,8 ± 0,8	52,8 ± 1,8	75,0 ± 2,00	127,8 ± 3,3
TDF 30 mg/L	7,0 ± 1,0	52,5 ± 1,5	71,7 ± 1,8	124,3 ± 2,2
TDF 3 mg/L	6,8 ± 1,3	57,8 ± 1,4	73,3 ± 2,8	126,0 ± 1,5
TDF 300 µg/L	5,8 ± 2,3	53,0 ± 4,0	73,3 ± 2,8	126,3 ± 3,9
TDF 30 µg/L	8,0 ± 1,5	53,0 ± 3,5	73,3 ± 0,9	126,3 ± 3,3
TDF 3 µg/L	6,8 ± 2,3	52,8 ± 1,8	72,0 ± 4,0	124,8 ± 3,7
TDF 300 ng/L	6,8 ± 1,3	52,5 ± 0,5	72,5 ± 2,5	125,0 ± 3,0

Tabela 19. Viabilidade e concentração total de hemócitos (média + desvio padrão) presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, após 21 dias de exposição.

População de hemócitos circulantes (10 ⁴ por mL de hemolinfa)				
Grupo	Células mortas	Granulócitos	Hialinócitos	Total
Controle (-)	6,8 ± 1,3	53,0 ± 2,0	74,3 ± 2,3	127,3 ± 3,6
TDF 300 mg/L	11,0 ± 1,0*	47,0 ± 3,0*	55,0 ± 2,00 *	102,0 ± 5,0*
TDF 30 mg/L	11,8 ± 3,8	43,5 ± 2,5	56,8 ± 5,3	100,3 ± 4,6
TDF 3 mg/L	9,5 ± 2,5	52,3 ± 1,3	71,0 ± 2,0	123,8 ± 1,4
TDF 300 µg/L	6,5 ± 1,2	52,5 ± 1,5	73,3 ± 2,8	125,8 ± 4,3
TDF 30 µg/L	7,0 ± 2,5	58,0 ± 6,0	71,8 ± 4,3	129,8 ± 10,3
TDF 3 µg/L	6,25 ± 1,9	53,7 ± 7,0	72,3 ± 3,3	124,8 ± 7,3
TDF 300 ng/L	6,5 ± 0,8	53,3 ± 1,3	75,3 ± 2,3	128,5 ± 3,5

* indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

Antes da exposição, a quantidade total de células (hemócitos) foram quantificadas com auxílio de uma câmara de Neubauer. Após a exposição, *in vitro*, ao fármaco por uma hora, foi observada uma queda estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da quantidade total de hemócitos viáveis, para as concentrações 300 mg/L, 30 mg/L, 3 mg/L, 300 µg/L e 3 µg/L, quando comparadas ao grupo controle negativo (Tabela 20). No entanto, a

concentração de granulócitos e hialinócitos não apresentaram alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$), entre os grupos controle e tratamento, resultado esperado para um estudo *in vitro*. No controle positivo, a exposição ao metanol a 10% provocou a morte de mais de 90% dos hemócitos. Não foram observadas alterações significativas entre a quantidade total de células avaliadas em cada grupo, que possam influenciar no resultado da análise.

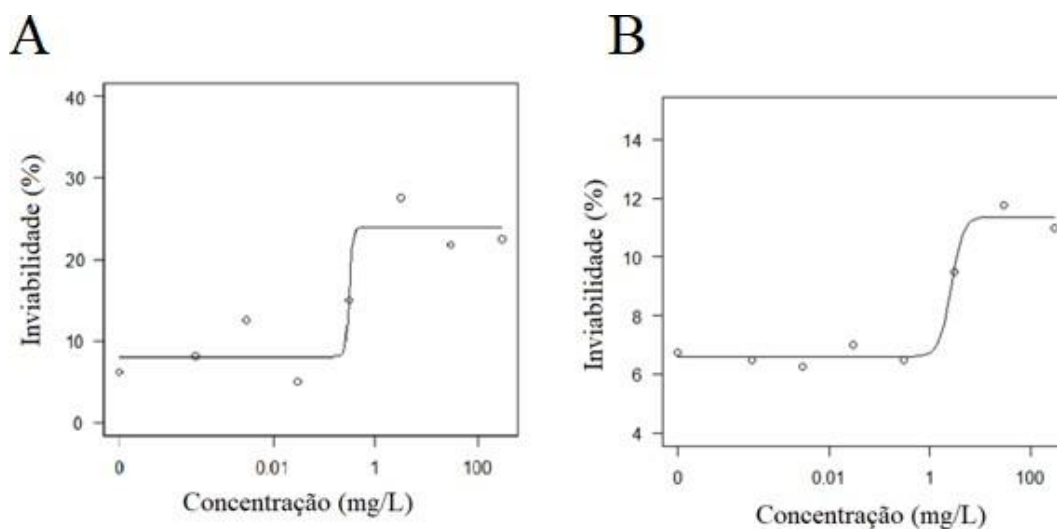
Tabela 20. Contagem total e diferencial de células (média + desvio padrão) circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, após uma hora de exposição.

População de hemócitos circulantes (10^5 células por mL de hemolinfa)				
Grupo	Células mortas	Granulócitos	Hialinócitos	Total
Controle (-)	$0,63 \pm 0,25$	$6,75 \pm 0,20$	$3,63 \pm 0,14$	$10,00 \pm 0,20$
Controle (+)	$9,69 \pm 0,55^*$	-	-	$10,44 \pm 0,47$
TDF 300 mg/L	$2,25 \pm 0,35^*$	$6,50 \pm 0,35$	$3,81 \pm 0,24$	$10,44 \pm 0,13$
TDF 30 mg/L	$2,19 \pm 0,31^*$	$6,38 \pm 0,14$	$3,19 \pm 0,31$	$10,25 \pm 0,54$
TDF 3 mg/L	$2,75 \pm 0,89^*$	$6,13 \pm 0,25$	$3,31 \pm 0,46$	$10,06 \pm 0,43$
TDF 300 μ g/L	$1,50 \pm 0,20^*$	$5,88 \pm 0,60$	$4,06 \pm 0,55$	$10,81 \pm 0,47$
TDF 30 μ g/L	$0,50 \pm 0,20$	$7,13 \pm 0,25$	$2,94 \pm 0,38$	$10,56 \pm 0,38$
TDF 3 μ g/L	$1,25 \pm 0,54^*$	$6,19 \pm 0,43$	$3,13 \pm 0,32$	$10,56 \pm 0,38$
TDF 300 ng/L	$0,81 \pm 0,38$	$6,19 \pm 0,52$	$3,81 \pm 0,13$	$10,19 \pm 0,63$

* indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

As curvas da inviabilidade dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao TDF são mostradas na Figura 18. Com base na inviabilidade em função das concentrações de TDF, a concentração efetiva (CE50), de TDF para hemócitos de *Biomphalaria glabrata* foi estimado em 0,30 (0,24; 0,36) mg/L em uma hora de tratamento *in vitro*. A CE50 de TDF para hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exposto por 21 dias (*in vivo*) foi de 2,65 (1,98; 5,29) mg/L. Não foi possível estimar a concentração efetiva após exposição de 72 horas (*in vivo*) dos moluscos.

Figura 18 - Inviabilidade dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao aumento das concentrações de TDF por uma hora (*in vitro*) (A) e 21 dias (*in vivo*) (B).

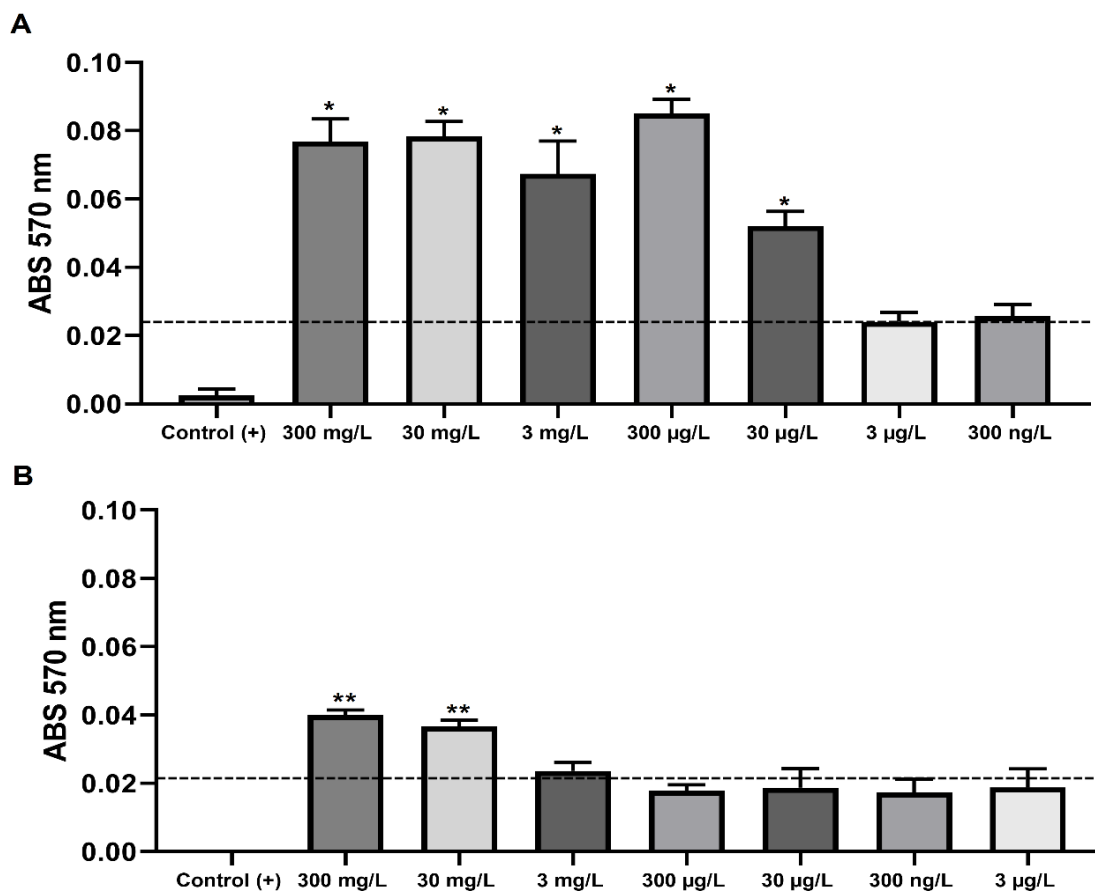


Atividade metabólica

Como pode ser visto anteriormente nas tabelas 19 e 20, houve uma diminuição estatisticamente significativa do número de hemócitos viáveis após a exposição ao fármaco *in vivo* por 21 dias e *in vitro* por uma hora. Assim, nossos resultados demonstraram que a exposição direta e indireta dos hemócitos ao TDF é responsável por danos citotóxicos as células internas de defesa do molusco.

Além disso, a partir do ensaio de avaliação da atividade metabólica celular, pelo método do MTT, *in vitro* (Figura 19 - A), foi possível observar um aumento da atividade, estatisticamente significativo ($p < 0,05$), das células sob exposição ao fármaco, em relação ao controle negativo, para todas as concentrações testadas. Porém, apenas as concentrações de 300 mg/L e 30 mg/L de TDF foi capaz de aumentar significativamente a atividade metabólica dos hemócitos quando expostos os moluscos, *in vivo* (Figura 19 - B). Esses achados sugerem que o TDF induz um aumento da atividade metabólica dos hemócitos diretamente e indiretamente.

Figura 19. Resultado da análise de atividade metabólica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após exposição ao TDF.

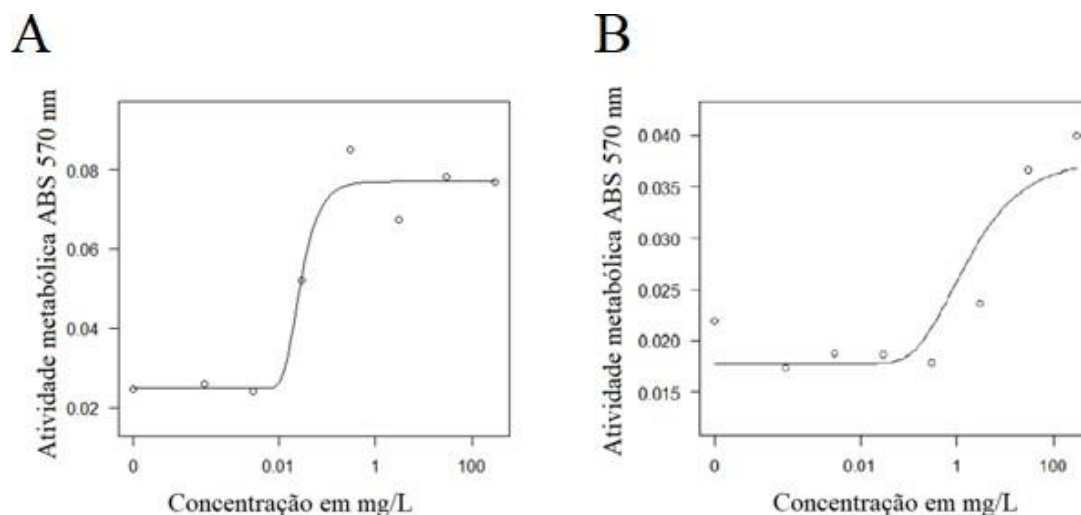


Legenda. A: Atividade metabólica (ensaio de MTT) de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos por uma hora, *in vitro*. B: Atividade metabólica (ensaio de MTT) de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos por uma hora, *in vivo*. (+) Controle positivo, expostos ao metanol 10%; (TDF) Grupo tratamento, exposto ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila em diferentes concentrações (300 mg/L; 30 mg/L; 3 mg/L; 300 µg/L; 30 µg/L; 3 µg/L e 300 ng/L); * indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo *in vitro* ($p < 0,05$); ** indica diferença significativa em relação ao grupo controle negativo *in vivo* ($p < 0,05$); A linha pontilhada em preto (---) representa o valor do grupo controle negativo. **Fonte:** Autor.

As curvas da atividade metabólica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao TDF são mostradas na Figura 20. Com base na atividade metabólica em função das concentrações de TDF, a concentração efetiva (CE50), de TDF para hemócitos de *Biomphalaria glabrata* foi estimado em 0,028 (0,025; 0,031) mg/L em uma hora de tratamento *in vitro*. A CE50 de TDF para hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exposto

por 21 dias (*in vivo*) foi de 1,62 (0,73; 2,51) mg/L. Não foi possível estimar a concentração efetiva após exposição de 72 horas (*in vivo*) dos moluscos.

Figura 20 - Atividade metabólica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao aumento das concentrações de TDF por uma hora (*in vitro*) (A) e 21 dias (*in vivo*) (B).

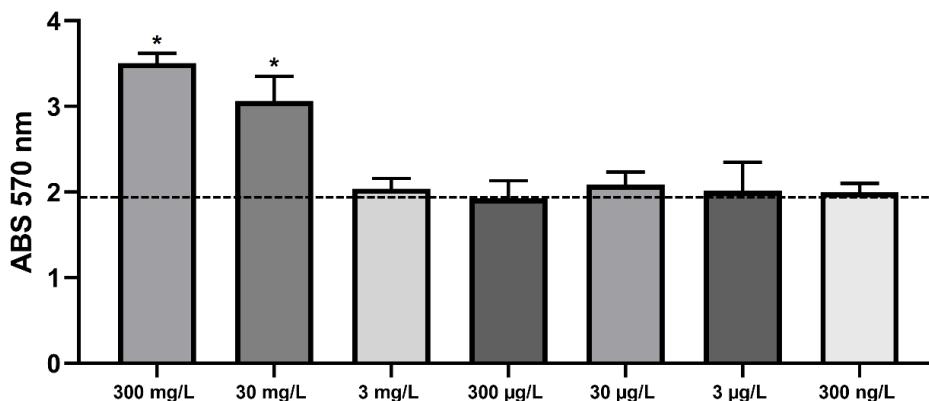


Produção de óxido nítrico

Análises prévias a este estudo mostraram que não foi possível determinar a concentração de óxido nítrico na amostra após exposição *in vitro* dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, por isso, neste estudo a produção de óxido nítrico (NO) foi estimada indiretamente apenas na fração solúvel da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, após a exposição *in vivo* ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

Foi possível observar uma baixa produção de óxido nítrico em todos os grupos tratamento, inclusive no grupo controle. No entanto, foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) no nível médio de óxido nítrico na hemolinfa apenas no grupo tratamento de 300 mg/L de TDF ($3,55 \pm 0,13$ nM/mL) e 30 mg/L de TDF ($3,06 \pm 0,29$ nM/mL) quando comparado ao controle ($1,97 \pm 0,07$ nM/mL), após exposição ao TDF (Figura 21).

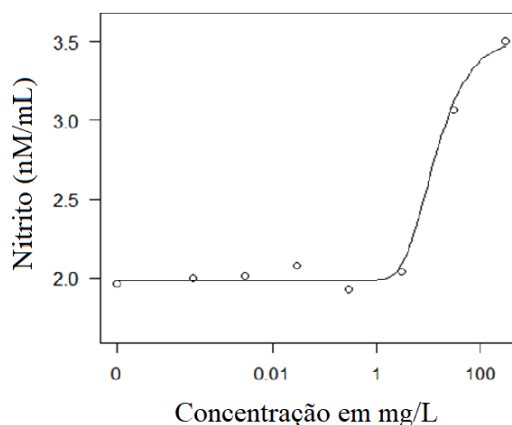
Figura 21. Resultado da análise de óxido nítrico quantificado na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* após exposição ao TDF.



Legenda: Produção de óxido nítrico pelos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos por 21 dias ao CBSS (controle negativo); TDF 300 mg/L; TDF 30 mg/L; TDF 3 mg/L; TDF 300 µg/L; TDF 30 µg/L; TDF 3 µg/L e TDF 300 ng/L. Os dados são apresentados a partir da leitura da absorvância (570 nm) em média e desvio padrão. A linha pontilhada em preto (---) representa os valores do grupo controle negativo. * indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$);

A curva de produção de óxido nítrico de *Biomphalaria glabrata* expostos ao TDF é apresentada na Figura 22. Com base na produção de óxido nítrico em função das concentrações de TDF, a concentração efetiva (CE50), de TDF para *Biomphalaria glabrata* foi estimado em 13,25 (6,84; 19,66) mg/L em 21 dias de tratamento *in vivo*. Não foi possível estimar a concentração efetiva após exposição aguda (*in vivo*) dos moluscos.

Figura 22 - Produção de óxido nítrico de *Biomphalaria glabrata* expostos ao aumento das concentrações de TDF por 21 dias *in vivo*.



Avaliação da atividade fagocítica

Durante as 72 horas, não foram observadas alterações quanto a atividade fagocítica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* ao TDF. Após exposição de 21 dias ao fármaco, os moluscos foram sacrificados e sua hemolinfa coletada para obtenção do hemócitos. Foi observado um aumento no índice de fagocitose apenas no grupo exposto ao fármaco, em relação ao grupo controle, na concentração de 300 mg/L e TDF 3 µg/L (Tabela 21), indicando que a exposição do molusco ao antirretroviral pode estimular suas células de defesa interna e aumentar sua atividade fagocítica na presença do TDF. Antes da análise, a quantidade de células foi mensurada, assim como sua viabilidade, com auxílio de uma câmara de Neubauer, para garantir uma padronização do número de células em cada grupo.

Tabela 21. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, após 21 dias de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

População de hemócitos circulantes (10⁵ por mL de hemolinfa)				
Grupo	Índice de fagocitose	Beads por célula	Total de beads intracelulares	Total de hemócitos
Controle (-)	28,39 ± 1,41	0,74 ± 0,04	74,72 ± 3,72	10,47 ± 0,33
TDF 300 mg/L	38,84 ± 2,04*	1,02 ± 0,05*	102,20 ± 5,37*	10,52 ± 0,23
TDF 30 mg/L	27,44 ± 1,76	0,72 ± 0,05	72,20 ± 4,64	10,15 ± 0,41
TDF 3 mg/L	27,61 ± 1,31	0,73 ± 0,03	72,57 ± 3,45	10,24 ± 0,30
TDF 300 µg/L	27,89 ± 2,13	0,73 ± 0,06	73,38 ± 5,60	10,46 ± 0,18
TDF 30 µg/L	28,32 ± 1,32	0,75 ± 0,03	74,52 ± 3,47	10,42 ± 0,36
TDF 3 µg/L	26,53 ± 1,02*	0,70 ± 0,03	69,82 ± 2,68	10,31 ± 0,39
TDF 300 ng/L	26,74 ± 1,80	0,70 ± 0,50	70,37 ± 4,75	10,45 ± 0,19

* indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

O ensaio de atividade fagocítica foi realizado em triplicata com diferentes amostras de hemócitos expostos, *in vitro*, por uma hora ao TDF. Foi demonstrado no ensaio um aumento no índice de fagocitose nos grupos expostos ao fármaco em relação ao grupo controle nas concentrações 300 mg/L; 30 mg/L; 3 mg/L; 300 µg/L; 30 µg/L e 3 µg/L, sugerindo que a exposição ao antirretroviral pode estimular a atividade fagocítica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*.

Para essas concentrações, a exposição aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade fagocítica, visto que, foi possível observar um aumento na quantidade de *beads* intracelulares, na razão *beads* por célula e no índice de fagocitose, quando comparados ao grupo controle. Antes da exposição, a quantidade de células total (hemócitos) foi mensurada com auxílio de uma câmara de Neubauer em que foi possível observar que não houve alterações significativas entre a quantidade total de células (Tabela 22).

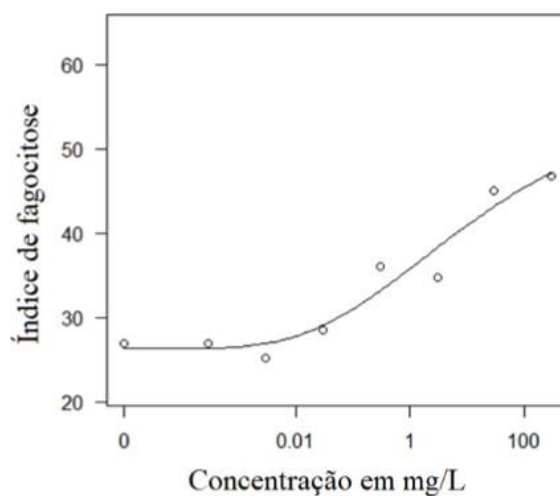
Tabela 22. Atividade fagocítica (média + desvio padrão) dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, após uma hora de exposição ao Fumarato de Tenofovir Desoproxila.

População de hemócitos circulantes (10^5 por mL de hemolinfa)				
Grupo	Índice de fagocitose	Beads por célula	Total de beads intracelulares	Total de hemócitos
Controle (-)	26,91 \pm 1,05	0,71 \pm 0,03	70,81 \pm 5,44	10,75 \pm 0,75
TDF 300 mg/L	46,79 \pm 1,70*	1,23 \pm 0,04*	123,13 \pm 4,48*	10,56 \pm 0,38
TDF 30 mg/L	45,01 \pm 2,22*	1,18 \pm 0,06*	118,44 \pm 5,83*	10,77 \pm 0,74
TDF 3 mg/L	34,82 \pm 1,15*	0,92 \pm 0,03*	91,63 \pm 3,04*	10,19 \pm 0,63
TDF 300 μ g/L	36,12 \pm 0,79*	0,95 \pm 0,02 *	95,06 \pm 2,08*	10,50 \pm 1,57
TDF 30 μ g/L	28,57 \pm 0,74*	0,75 \pm 0,02*	75,19 \pm 1,95*	10,94 \pm 0,38
TDF 3 μ g/L	25,19 \pm 2,19*	0,66 \pm 0,06*	66,38 \pm 5,75*	10,31 \pm 0,66
TDF 300 ng/L	26,91 \pm 1,69	0,71 \pm 0,04	70,81 \pm 4,46	10,19 \pm 1,14

* indica diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

A curva do índice de fagocitose dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao TDF é apresentada na Figura 23. Com base no índice de fagocitose em função das concentrações de TDF, a concentração efetiva (CE50), de TDF para hemócitos de *Biomphalaria glabrata* foi estimado em 9,84 (1,60; 13,56) mg/L em uma hora de tratamento *in vitro*. Não foi possível estimar a concentração efetiva após exposição *in vivo*, aguda e crônica, dos moluscos.

Figura 23 - Atividade fagocítica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos ao aumento das concentrações de TDF por uma hora *in vitro*.



DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que avalia os efeitos ecotoxicológicos do Fumarato de Tenofovir Desoproxila sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* (*in vivo*) e seus hemócitos (*in vitro*). Verificou-se neste estudo que o *Biomphalaria glabrata* demonstrou resistência frente a exposição ao TDF por 72 horas e 21 dias, tolerando concentrações de até 300 mg/L, uma vez que não foram observadas mortalidades significativas, comparando ao grupo controle. Contudo, quando avaliados outros parâmetros, como comportamento e citotoxicidade sobre os hemócitos, observou-se que o fármaco foi capaz de provocar alterações significativas ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo.

Os ensaios realizados *in vitro*, apresentaram resultados que comprovam que o TDF é capaz de estimular as células de defesa dos moluscos. Contudo, acredita-se que, inicialmente, o TDF induz o aumento da atividade metabólica e fagocítica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, mas com a persistência desse estímulo, pode haver um aumento da morte dessas células, mesmo que em baixas concentrações (300 $\mu\text{g/L}$). Por outro lado, o aumento da mortalidade dos hemócitos, assim como a redução de sua concentração na hemolinfa, foi observado apenas durante a exposição crônica dos moluscos *in vivo* a maiores concentrações do fármaco (300 e 30 mg/L).

O aumento da ativação celular foi determinado por meio de MTT, pode ser explicado pela presença do estímulo, neste caso o TDF. Quando o MTT é reduzido pelo hemócito, ocorre a produção de cristais de formazan, de forma proporcional as condições metabólicas das células (Bezerra *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2006). Assim, os resultados indicam que as células estariam ativadas pelo contato com o resíduo, provocando o estímulo não apenas de atividades metabólicas, mas também sua capacidade fagocítica, uma vez que existe uma correlação direta entre os ensaios de fagocitose e atividade metabólica (Bezerra *et al.*, 1999). Como pode ser visto, um aumento, estatisticamente significativo, na taxa de fagocitose dos hemócitos circulantes foi observada, uma hora pós-exposição do hemócito.

Após exposição *in vivo* dos moluscos ao TDF, observou-se que quantidade de NO sofreu um aumento significativo apenas nas concentrações de exposição de 300 e 30 mg/L de TDF. A ativação dos hemócitos, estimada, *in vitro*, pela atividade metabólica celular (teste MTT) corroboram com os achados, *in vivo*, da produção de óxido nítrico, principalmente em concentrações mais elevadas do fármaco, sugerindo que o TDF é capaz de provocar o aumento da produção de NO pelos hemócitos. Esse aumento, pode ser resultado da capacidade do TDF de estimular a quinase extracelular regulada por sinal (ERK), responsável pela regulação da produção de NO em hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, e conseqüentemente, aumentar os níveis de óxido nítrico presentes na hemolinfa (Pereira *et al.* 2006; Zahoor *et al.*, 2009).

A partir da análise comportamental, foi possível observar que quando expostos ao fármaco em altas concentrações, os moluscos tendem a apresentar uma maior frequência do comportamento de fuga, ficando mais tempo fora da água do que o grupo controle e os demais tratamentos. Esse comportamento pode contribuir para uma redução da exposição do molusco ao TDF e conseqüentemente, uma redução da concentração do fármaco em seu organismo (Pieri & Jurberg, 1981).

A partir dos resultados observados *in vitro*, previa-se que a exposição dos moluscos ao TDF resultaria em uma redução na concentração de hemócitos na hemolinfa, ou seja, hemocitopenia. No entanto, apenas durante a exposição crônica foi possível observar alterações quanto a concentração total de hemócitos presentes na hemolinfa em moluscos expostos ao TDF na concentração de 300 e 30 mg/L. Esta hemocitopenia pode ser resultado da persistência crônica ao estímulo e/ou pela baixa produção de células pelo

órgão produtor de amebócitos, levando uma redução da concentração de hemócitos na hemolinfa (Sullivan *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2016).

Além do antirretroviral TDF, outros estudos utilizando o *Biomphalaria glabrata*, como modelo biológico, para avaliação da toxicidade de diferentes fármacos, como antineoplásico (Nakano *et al.*, 2003), anti-inflamatório (Sullivan *et al.*, 2005) e hormonais (Rivero-Wendt *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016), foram realizados. Os moluscos expostos por dez dias ao antineoplásico Ciclofosfamida, apresentaram alterações no desenvolvimento embrionário (Nakano *et al.*, 2003). Aqueles expostos por 72 horas ao anti-inflamatório Colchicina, apresentaram aumento da frequência de figuras mitóticas e hiperplasia, aumento da concentração média de hemócitos, aumento da mortalidade dos moluscos e sinais claros de intoxicação, como a dificuldade de fixação do molusco (Sullivan *et al.*, 2005). Por fim, os moluscos expostos por quatro semanas e 30 dias aos resíduos hormonais de 17α -methyltestosterone (MT) e 5 α -dihydrotestosterone (DHT) apresentaram um aumento da produção de espermatozoides, redução na sobrevivência, alterações no tamanho da concha e peso (Rivero-Wendt *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2016).

Quanto ao resíduo farmacêutico TDF, outros organismos foram utilizados como modelos biológicos para avaliar os potenciais efeitos ecotoxicológicos desse fármaco, como o microcrustáceo *A. salina*. Essa espécie, assim como *Biomphalaria glabrata*, é um organismo filtrador capaz de bioacumular substâncias em seu organismo (More *et al.*, 2014; Riisgard *et al.*, 2015). Em concentração de 111.82 mg/L, após 24 horas de exposição, *A. salina* apresentou a inibição de 50% dos organismos (Silva *et al.*, 2019), concentração capaz de provocar alterações em *Biomphalaria glabrata*.

Além do molusco *Biomphalaria glabrata* e *A. salina*, consumidores primários da cadeia alimentar, outros organismos como cianobactérias (*Microcystis novacekii*) e bactérias (*Aliivibrio fischeri*), produtor primário e decompositor, respectivamente, foram utilizados como modelos biológicos para avaliações ecotoxicológicas do TDF. *M. novacekii*, exposta por 96 horas ao TDF apresentou IC 50% de 161.01 mg/L, enquanto a *A. fischeri* exposta por 15 minutos apresentou IC 50% de 14.83 mg/L (Silva *et al.*, 2019).

Essa variação na toxicidade do TDF observada para as diferentes espécies de organismos deve-se a diferentes fatores. Além do tempo de exposição, a interação entre o fármaco e o organismo de cada espécie, deve ser levada em consideração. Apesar do conhecimento da presença do resíduo do TDF em diferentes corpos de água pelo mundo

(Wood *et al.*, 2015; Wilkinson *et al.*, 2022), poucos estudos ambientais sobre o impacto desse resíduo, no meio ambiente aquático, foram descritos na literatura.

Além disso, no tratamento do HIV, na maioria dos casos, o TDF é administrado em conjunto com outros fármacos, os quais não foram testados neste trabalho. Sendo assim, a presença desses outros resíduos no ambiente pode contribuir e potencializar efeitos tóxicos sobre o molusco, aumentando os danos causados ao ecossistema. Por este motivo, para avaliar a ecotoxicidade de determinada substância, é preciso levar em consideração a utilização de organismos de diferentes níveis tróficos, pois cada espécie pode reagir de maneira própria aos efeitos da substância.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi apresentada a utilização do *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos em uma nova perspectiva. Sua utilização, tanto para avaliações *in vivo* como *in vitro* se mostraram viáveis para avaliar poluentes emergentes, como resíduos farmacêuticos, pois além de apresentarem possibilidades de resposta *in vivo* e *in vitro*, são capazes de desenvolver resposta frente a substâncias insolúveis. A partir dos ensaios utilizados para estimar a toxicidade do TDF sobre *Biomphalaria glabrata*, a exposição, crônica, nas concentrações 300 mg/L, 30 mg/L e 3 mg/L, mostraram-se tóxicas para o molusco. Além disso, avaliou-se a hemolinfa destes moluscos, foi possível observar uma redução significativa da concentração de hemócitos, provocando uma possível redução de sua capacidade de defesa interna. Embora essa redução ocorra apenas em concentrações mais altas do TDF, é necessário considerar sua estabilidade, atividade e capacidade de se bioacumular no ambiente e em organismos aquáticos. A partir desses resultados, para ecossistemas aquáticos, de acordo com o GHS (GHS, 2011), o TDF pode ser considerado como uma substância tóxica para *Biomphalaria glabrata*, pois foi capaz de causar efeitos nocivos em concentrações entre 1 mg/L e 10 mg/L após exposição crônica (21 dias) do molusco.

REFERÊNCIAS

ABAZA, B.E; HAMZA, R.S; FARAG, T.I; et al. Characterization of the hemocytes of susceptible and resistant *Biomphalaria alexandrina* snail. **J Egypt Soc Parasitol**, 46(3): 671 – 682, 2016.

ANDREATTA, K.M; MILLER, M.D.P; WHITE, K.L.P. HIV-2 antiviral potency and selection of drug resistance mutations by the integrase strand transfer inhibitor elvitegravir and NRTIs emtricitabine and tenofovir in vitro. **The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 62: 367-74, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31827b55f1>.

BADAWY, M.I; WAHAAB, R.A; EL-KALLINY, A.S. Fenton-biological treatment processes for the removal of some pharmaceuticals from industrial wastewater, **J. Hazard. Mater.**, 167: 567-574, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.023>.

BARBOSA, F.S., BARBOSA, C.S. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, 10(2): 200 – 209, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X199400020000>

BEZERRA, F. S.M; NOGUEIRA-MACHADO, A.J; CHAVES, M.M; et al. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo [online]**. 39(4): 197-202, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000400003>.

BEZERRA, F.SM; COELHO, P.M; CHAVES, M.M; et al. Comparative study on the effect of cyclic nucleotides related to the function of *Biomphalaria glabrata* hemocytes and human granulocytes. **Acta Trop.** 30;72(3): 275-80, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(99)00004-2).

CAVALCANTI, M.G.S; MENDONÇA, A.M.B; DUARTE, G.R; et al. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, 43: 285 – 291, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.09.002>.

COSTA, C.R; OLIVI, P; BOTTA, C.M.R; et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**, 31(7): 1820 – 1830, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.

DEAN, P; RICHARDS, E.H; EDWARDS, J.P; et al. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Dev. Comp. Immunol.** 28, 689–700, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.11.006>

FRYER, S.E., BAYNE, C.J. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by absorbed plasma components. **Dev Comp Immunol**, 20: 323 – 337, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(95\)00039-v](https://doi.org/10.1016/0145-305x(95)00039-v)

GEBOERS, S; HAENEN, S; MOLS, R; et al. Intestinal behavior of the ester prodrug tenofovir DF in humans. **Int. J. Pharm.**, 15: 131, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.002>.

Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). **Part 4: Environmental hazards**. United Nations, 2011.

GODOY, A.A; KUMMROW, F; PAMPLIN, P.A. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. **Chemosphere**, 138, 281-91, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>

GREEN, L.C; WAGNER, D.A; GLOGOWSKI, J; et al. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126: 131-138, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x).

HELAL, E.G; EL-DAFRAWY, S.M; MOHAMED, A.H; et al. Analysis of circulating hemocytes from *Biomphalaria alexandrina* following *Schistosoma mansoni* infection using flow cytometry. **Egypt. J. Hosp. Med.**, 54: 41 – 53, 2014. DOI: <https://doi.org/10.12816/0002430>.

HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, 426: 33 – 38, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02021>.

KAUR, S; BAYNES, A; LOCKYER, A.E; et al. Steroid Androgen Exposure during Development Has No Effect on Reproductive Physiology of *Biomphalaria glabrata*. **PLoS One**, 11(7): e0159852, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159852>

KEARNEY, B.P; FLAHERTY, J.F; SHAH, J. Tenofovir disoproxil fumarate clinical pharmacology and pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**. 43: 595-612, 2004. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003088-200443090-00003>

LEITE, D.I; FARIA, J.V; AZEVEDO, L.V; et al. Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese. **Rev. Virtual Quim.**, 7 (6): 2347-2376, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150140>

LIMA, M.V; PEREIRA, M.I.A; FILHO, P.E.C; et al. Studies on Toxicity of Suspensions of CdTe Quantum Dots to *Biomphalaria glabrata* Mollusks. **Environ Toxicol Chem.**, 38(10): 2128 – 2136, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.4525>.

LOVERDE, P.T; GHERSON, T; RICHARDS C.A. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*, fine structure. **Dev. Comp. Immunol.**, 31: 999, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(82\)80030-x](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(82)80030-x).

MAHMOOD, A.R; AL-HAIDERI, H.H; HASSAN, F.M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. **Advances in Public Health**, 2019: 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7851354>.

MARTINS-SOUZA, R.L; PEREIRA, C.A.J; COELHO, P.M.Z; et al. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitol. Res.** 91, 500–507, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0985-4>.

MASHO, S.W; WANG, C; NIXON, D.E; 2007. Review of tenofovir-emtricitabine. **Therapeutics and clinical risk management**, 3(6): 1097, 2007.

MEINTJES, G; MOORHOUSE, M.A; CARMONA, S; et al. Adult antiretroviral therapy guidelines. **S Afr J HIV Med**, 18(1), 2017. DOI: <https://doi.org/10.4102/sajhivmed.v18i1.776>.

MORE, T. T; YADAV, J. S; YAN, S; et al. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, 144: 1–25, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>.

MOSS, D.M; DOMANICO, P; WATKINS, M; et al. Simulating Intestinal Transporter and Enzyme Activity in a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Tenofovir Disoproxil Fumarate. **Antimicrob Agents Chemother**, 27; 61(7), 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00105-17>.

MURPHY, R.A., VALENTOVIC, M.A. Factors Contributing to the Antiviral Effectiveness of Tenofovir. **J Pharmacol Exp Ther**, 363(2): 156-163, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.117.243139>.

NAKANO, E; WATANABE, L.C; OHLWEILER, F.P; et al. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutat. Res.**, 536: 145 – 154, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(03\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(03)00042-1).

NELSON, M.K; CRUZ, B.C; BUENA, K.L; et al. Effects of abnormal temperature and starvation on the internal defense system of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. **J Invertebr Pathol**. 138: 18-23, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.05.009>.

OLIVEIRA-FILHO, E.C; NAKANO, E; TALLARICO, L. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria* sp.: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. **Invertebr. Reprod.**, 61: 49 – 57, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/07924259.2016.1276484>.

PELLEGRINO, J., KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. In: **Advances in Parasitology** (D. Ben, ed.), 233-290, 1968.

PEREIRA, C.A; MARTINS-SOUZA, R.L; COELHO, P.M; et al. Effect of *Angiostrongylus vasorum* infection on *Biomphalaria tenagophila* susceptibility to *Schistosoma mansoni*. **Acta Trop.**, 98(3): 224 – 33, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.002>.

PIERI, O.S., JURBERG, P. Comportamento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) como critério de toxicidade em ensaios biológicos com moluscidas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 76 (2): 147 – 160, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761981000200006>.

RIISGARD, H. U; JEUNE, N; PLEISSNER, D; et al. Adaptation of the brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) to filter-feeding: effects of body size and

temperature on filtration and respiration rates. **Journal of Crustacean Biology**, 35(5): 650–658, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002362>.

RITZ, C., BATY, F., STREIBIG, J.C. AND GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLoS ONE**, 10, e0146021, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>

RIVERO-WENDT, C.L.G; BORGES, A.C; OLIVEIRA-FILHO, E.C; et al. Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **Genetics and Molecular Research**, 13(1): 605 – 615, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4238/2014.January.28.6>.

ROWLEY, A.F., POWELL, A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? **J Immunol.**, 179(11): 7209-14, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7209>.

SILVA, S.R; BARBOSA, F.A.R; MOL, M.P.G; et al. Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, 10: 1565-1577, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4236/jep.2019.1012093>.

SIQUEIRA, W.N; FRANÇA, E.J; PEREIRA, D.R; et al. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere**, 249: 126218, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126218>.

SOKOLOVA, I.M. Apoptosis in molluscan immune defense. **Invertebr Surviv J.**, 6: 49 – 58, 2009.

SULLIVAN, J.T., CASTRO, L. Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine. **J Invertebr Pathol.**, 90(1): 32-8, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.04.005>.

TALLARICO, L.F. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. **Am. Malacol. Bull.** 33 (2): 330 – 336, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>.

VAN DER KNAAP, W.P.W., LOKER, E.S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. **Parasitology Today**, 6: 175 – 182, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90349-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90349-9).

WILKINSON, J.L; BOXALL, A.B.A; KOLPIN, D.W; et al. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 119(8):e2113947119, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2113947119>.

WOOD, T.P; DUVENAGE, C.S.J; ROHWER, E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. **Environ Pollut**. 199: 235 – 243, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.030>.

ZAHOOR, Z; DAVIES, A.J; KIRK, R.S; et al. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. **Parasites Vectors**. v.2, n.18, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-18>

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da revisão no capítulo 2, foi possível observar que um número considerável de artigos utilizando *Biomphalaria glabrata* em ensaios de ecotoxicidade vem sendo realizados. Contudo, poucos estudos dão ênfase aos efeitos da exposição de resíduos farmacêuticos e seus metabólitos sobre os hemócitos. Além disso, não foram encontrados estudos que realizem ensaios como atividade metabólica e produção de óxido nítrico na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, ambos potenciais bioindicadores para estudos de ecotoxicidade.

Já no capítulo 3, observamos que para obter bons resultados, não basta apenas um bom delineamento do experimento *in vitro*, mas também o bem-estar físico e biológico do molusco. Além dos cuidados básicos com a manutenção e criação dos moluscos, o controle da qualidade da água do aquário de criação também deve ser respeitado. Neste capítulo foi demonstrada a importância de se avaliar as opções disponíveis para o ensaio, desde o meio de cultura até os diferentes tempos de exposição dos hemócitos. A partir dessa padronização do ensaio, foi possível estabelecer os melhores tempos de incubação com o fármaco, as micropartículas e o corante MTT para ensaios de citotoxicidade em

estudos de ecotoxicologia, contribuindo para o desenvolvimento de novos estudos na área.

Desta forma, no capítulo 4 teve-se como objetivo apresentar novas possibilidades de ensaios utilizando o *Biomphalaria glabrata* como modelo biológico em estudos de ecotoxicidade, com ênfase em resíduos farmacêuticos e seus efeitos citotóxicos sobre os hemócitos. Além disso, sua utilização, tanto para avaliações *in vivo* como *in vitro* se mostraram viáveis para avaliar poluentes emergentes, como resíduos farmacêuticos, pois além de apresentarem possibilidades de resposta *in vivo* e *in vitro*, são capazes de desenvolver resposta frente a substâncias insolúveis.

Deve-se destacar também que, no caso da doença AIDS, a maioria dos tratamentos são realizados utilizando um conjunto de fármacos, os quais não foram testados neste trabalho e que também se encontram no ambiente aquático. Sendo assim, as presenças desses outros resíduos presentes no meio ambiente aquático podem contribuir, ou não, para a potencialização dos efeitos ecotoxicológicos sobre o molusco e seus hemócitos, aumentando ainda mais os danos causados ao ecossistema.

Sabendo-se da existência de diversos resíduos farmacêuticos em corpos de água por todo mundo, somada a dificuldade de sua remoção e aos efeitos deletérios para incontáveis espécies, avaliar seus efeitos é fundamental para promover formas de tratamento e redução dos resíduos. Isto porque, a responsabilidade da produção de conhecimentos sobre o impacto ambiental desses resíduos é tanto do setor farmacêutico como da academia. Para isso, a avaliação ecotoxicológica de determinada substância deve levar em consideração a utilização de organismos de diferentes níveis tróficos, pois cada espécie pode reagir de maneira própria aos efeitos da substância. Desta forma, a promoção de estudos como este podem contribuir para minimização dos riscos tanto ao ambiente, quanto à saúde humana.

REFERÊNCIAS

ABAZA, B.E; HAMZA, R.S; FARAG, T.I; ABDEL-HAMID, M.A; MOUSTAFA, R.A. Characterization of the hemocytes of susceptible and resistant *Biomphalaria alexandrina* snail. **J Egypt Soc Parasitol.** v. 46, n. 3, p. 671-682, 2016.

ACERO, J.L; BENITEZ, F.J; REAL, F.J; ROLDAN, G; RODRIGUEZ E. (2013). Chlorination and bromination kinetics of emerging contaminants in aqueous systems. **Chem. Eng. J.**, v. 219, p. 43-50, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.067>.

AGUNBIADE, F. O., MOODLEY, B. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 36-46, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3144>.

ANDREATTA, K.M; MILLER, M.D.P; WHITE, K.L.P. HIV-2 antiviral potency and selection of drug resistance mutations by the integrase strand transfer inhibitor elvitegravir and NRTIs emtricitabine and tenofovir in vitro. **The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 62, p. 367-74, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31827b55f1>

BADAWY, M.I; WAHAAB, R.A; EL-KALLINY, A.S. Fenton-biological treatment processes for the removal of some pharmaceuticals from industrial wastewater. **J. Hazard. Mater.**, v. 167, p. 567-574, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.023>.

BARBOSA, F.S., BARBOSA, C.S. The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 200-209, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000200007>.

BEDNER, M., MACCREHAN W.A. Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1, 4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, p. 516-522, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/es0509073>.

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral Research.** v. 85, n. 1, p. 1– 18, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.002>.

CABAN, M; LIS, E; KUMIRSKA, J; STEPNOWSKI, P. Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM)

method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization. **Sci. Total. Environ.** v. 538, p. 402–411, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.076>

CAVALCANTI, M.G.S; et al. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, v. 43, n. 3, p. 285-291, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.09.002>.

COLES, J.A; FARLEY, S.R; PIPE, R.K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. **Dis. Aquat. Org.**, v. 22, p. 59-65, 1995. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao022059>

COSTA, C.R; et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova.** v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.

DAOUK, S. et al. Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents. **J Environ Manage**, v. 160, p. 324- 332, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.037>

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 1, n. 1, p. 13–25, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd703>.

DEAN, P; RICHARDS, E.H; EDWARDS, J.P. et al. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Dev. Comp. Immunol.** v. 28, p. 689–700, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.11.006>.

DECHRISTOFORO, R. & PENZAK, S. R. Tenofovir: a nucleotide analogue reverse-transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection. *American Journal of Health system Pharmacy.*, v.61, n.1, p. 86-98, 2004.

DIAS, L.C.S; UETA, M.T; GUARALDO, A.M.A. Suscetibilidade de *biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 29(4), p.205-212, 1987.

FABBRI, R. Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*,1340, 20-28, 2015.

FUNG, H.B; STONE, E.A; PIACENTI, F.J. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther.* 24(10):1515-48, 2002.

GALVÃO, F. Brazil and Access to HIV/AIDS Drugs: A Question of Human Rights and Public Health. *American Journal of Public Health*; 95, p. 1110-1116, 2005.

GEBOERS, S; HAENEN, S; MOLS, R; et al. Intestinal behavior of the ester prodrug tenofovir DF in humans, *Int. J. Pharm.*, 15, 131-7, 2015.

GHOSH, P; THAKUR, I.S; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 259-270, 2017.

GIEBUŁTOWICZ, J., NAŁĘCZ-JAWECKI, G. Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104: 103–10, 2014.

GIOVANELLI, A; et al. Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 35, (6), p.523-530, 2001.

GODOY, A.A; KUMMROW, F; PAMPLIN, P.A. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere*, 138, 281-91, 2015.

GREEN, L.C; WAGNER, D.A; GLOGOWSKI, J; SKIPPER, P.L; WISHNOK, J.K; TANNENBAUM, S. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.

HANNA, N. et al. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environ Int.*, v. 114 p. 131-142, 2018.

HELAL, E.G., et al. Analysis of circulating hemocytes from *Biomphalaria alexandrina* following *Schistosoma mansoni* infection using flow cytometry. *Egypt. J. Hosp. Med.* 54:41-53, 2014.

HILLYER, J.F. et al. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. **Microbiol celular.**, v. 7, n. 2005, p. 39-51, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00430.x>

HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**. v. 426, p. 33-38, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02021>.

HUERTA-FONTELA, M; PINEDA, O; VENTURA, F; GALCERAN M.T. New chlorinated amphetamine type stimulants disinfection-by-products formed during drinking water treatment. **Water Res.** p. 3304-3314, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.029>.

HUSSAIN, Y; DILAWAR, A; ULLAH, S; et al. Modelling the Spatial Distribution of Arsenic in Water and Its Correlation with Public Health, Central Indus Basin, Pakistan. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, 4, 18-25, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4236/gep.2016.42003>.

JASSAL, M.S; BAKMAN, I; JONES, B. Correlation of ambient pollution levels and heavily-trafficked roadway proximity on the prevalence of smear-positive tuberculosis. **Public Health**; v. 127, n. 3, p. 268-274, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2012.12.030>.

JOHNSTON, L.A., YOSHINO, T.P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory–secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 786-793, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0786:LSMESG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0786:LSMESG]2.0.CO;2).

KEARNEY, B.P; FLAHERTY, J.F; SHAH, J. Tenofovir disoproxil fumarate clinical pharmacology and pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 43, p. 595-612, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1304-1310.2006>.

KOT-WASIK, A; JAKIMSKA, A; ŚLIWKA-KASZYŃSKA, M. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. **Environ. Monit. Assess.** v. 188, n. 12, p. 661, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5637-0>.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **J Environ Manage**, v. 90, n. 8, p. 2354-2366, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>.

LANDRIGAN, P.J; STEGEMAN, J.J; FLEMING, L.E; et al. Human Health and Ocean Pollution. **Annals of Global Health**, v. 86, n. 1, p. 151, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5334/aogh.2831>

LEITE, D.I. et al. Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 6, p. 2347-2376, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150140>.

LIMA, M.V; SIQUEIRA, W.N; SILVA, H.A.M.F; et al. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environ Sci Pollut Res Int.** v. 26, n. 4, p. 3350-3356, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3848-3>

LO VERDE, P.T; GHERSON, T; RICHARDS C.A. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*, fine structure. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 31, p. 999, 1982. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(82\)80030-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(82)80030-X).

LOKER, E.S; ADEMA, C.M; ZHANG, S.M; KEPLER, T.B. Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunol Rev.**, v. 198, p. 10-24, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Sci Total Environ**, v. 473, p. 619-641, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>.

MAHMOOD, A.R; AL-HAIDERI, H.H; HASSAN, F.M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. **Advances in Public Health**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7851354>.

MARTINS-SOUZA, R.L; PEREIRA, C.A.J; COELHO, P.M.Z; ANDRADE, Z.A; NEGRAO-CORREA, D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitol. Res.** v. 91, p. 500–507, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0985-4>.

MASHO, S.W; WANG, C; NIXON, D. E. Review of tenofovir-emtricitabine. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 6, p. 1097, 2007.

MATRICON-GONDRAN, M., LETOCART, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 74, p. 224-234, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4877>.

MEINTJES, G. et al. Adult antiretroviral therapy guidelines. **S Afr J HIV Med**, v. 18, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4102/sajhivmed.v18i1.776>.

MINGUEZ, L; HALM-LEMEILLE, MP; COSTIL, K; et al. Assessment of cytotoxic and immunomodulatory properties of four antidepressants on primary cultures of abalone hemocytes (*Haliotis tuberculata*), **Aquatic Toxicology**, v. 153, p. 3-11, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.020>.

MONS, C; DUMÈTRE, A; GOSSELIN, S; GALLIOT, C; MOULIN, L. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. **Water Research**, v. 43, n. 1, p. 211-217, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.024>

MOSS, D.M; DOMANICO, P; WATKINS, M; et al. Simulating Intestinal Transporter and Enzyme Activity in a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Tenofovir Disoproxil Fumarate. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 61, n. 7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00105-17>.

MURPHY, R.A., VALENTOVIC, M.A. Factors Contributing to the Antiviral Effectiveness of Tenofovir. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 363, n. 2, p. 156-163, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.117.243139>.

NATH, K. Home hygiene and environmental sanitation: a country situation analysis for India. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, n. 1, p. 19–28, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/0960312031000102778>.

NCUBE, S. et al. Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives. **Water Res**, v. 145, p. 231-247, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.017>.

NICOLAI, A; FILSER, J; LENZ, R; BERTRAND, C; CHARRIER, M. Quantitative assessment of hemolymph metabolites in two physiological states and two populations of the land snail *Helix pomatia*. **Physiol Biochem Zool.** v. 85, n. 3, p. 274-84, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1086/665406>

PARAENSE, W.L. Histórico do gênero biomphalaria, morfologia e sistemática morfológica. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. **Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ**, p. 284-308, 2008. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788575413708>.

PELLEGRINO, J., KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. In: **Advances in Parasitology** (D. Ben, ed.), p. 233-290, 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60475-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60475-3).

PENG, X; OU, W; WANG, C; et al. (a). Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. **Sci. Total Environ.**, v. 490, p. 889-898, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.068>.

PENG, X; WANG, C; ZHANG, K; et al. (b). Profile and behavior of antiviral drugs in aquatic environments of the Pearl River Delta, China. **Sci. Total Environ.**, v. 466, p. 755-761, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.062>.

PRASSE, C; SCHLÜSENER, M.P.; SCHULZ, R; TERNES, T.A. Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance? **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, p. 1728-1735, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/es903216p>.

REMYNGTON, J. P. & BERINGER, P. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2393, 2006.

ROWLEY, A.F., POWELL, A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? **J Immunol.** v. 179, n. 11, p. 7209-14, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7209>.

RUSSO, D; SICILIANO, A; GUIDA, M; et al. Removal of Antiretroviral Drugs Stavudine and Zidovudine in Water under UV254 and UV254/H2O2 Processes: Quantum Yields, Kinetics and Ecotoxicology Assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 349, p. 195-204, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.052>.

RZYMSKI, P; DREWEK, A; KLIMASZYK, P. Pharmaceutical pollution of aquatic environment: an emerging and enormous challenge. **Limnol Review**, v. 17, n. 2, p. 97-107, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1515/limre-2017-0010>.

SHEN, R., ANDREWS, S.A. Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection. **Water Res.**, v. 45, p. 944-952, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.036>.

SHUMWAY, S.E. Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. **Mar. Biol.** v. 41, p. 153–177, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00394023>.

SILVA, S.R; BARBOSA, F.A.R; MOL, M.P.G; MAGALHÃES, S.M.S. Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, v. 10, p. 1565-1577, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4236/jep.2019.1012093>.

SIQUEIRA, W.N; FRANÇA, E.J; PEREIRA, D.R; et al. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Chemosphere.**, v. 249, p. 126218, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126218>.

SOKOLOVA, I.M. Apoptosis in molluscan immune defense. **Invertebr Surviv J.**, v. 6, p. 49–58, 2009.

SOUFAN, M; DEBORDE, M; LEGUBE, B. Aqueous chlorination of diclofenac: kinetic study and transformation products identification. **Water Res.**, 46, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.056>.

SOUZA, S., ANDRADE, Z.A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, n. 1, p. 213-218, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900033>.

TEERAANANCHAI, S; KERR, S; AMIN, J; et al. Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. **HIV Medicine.**, v. 18, n. 4, p. 256–266, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/hiv.12421>.

The Joint United Nations Programme on HIV and AIDS (UNAIDS). **Aids by the numbers**. UNAIDS Data. 2019. Disponível em: <https://www.unaids.org/en>

TIBIRIÇÁ, S.H.C. et al. Avaliação biométrica de *Biomphalaria* spp. (Preston, 1910) no município de Juiz de Fora, MG. *Revista De Patologia Tropical*, 38(1), 52–62, 2009.

TOLBOOM S. N. et al. Algal-based removal strategies for hazardous contaminants from the environment – A review. *Sci Total Environ*, v.665 p. 358–366, 2019.

TULCHINSKY, T.H., VARAVIKOVA E.A. A History of Public Health. **The New Public Health**. 2014:1–42, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415766-8.00001-X>

VAN DER KNAAP, W.P. W., LOKER, E.S. Immune mechanisms in Trematode-snails Interactions. **Parasitol. Today**, v. 6, p. 175-182, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90349-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90349-9).

VILLEGAS-NAVARRO, A. et al. Determination of LC50 from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. **Environment International**, v. 23, n. 4, p. 535-540, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(97\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00059-7).

WAGIL, M; KUMIRSKA, J; STOLTE, S; et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland, **Sci. Total Environ**. v. 493: p. 1006–1013, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.082>

WOOD, T.P; DUVENAGE, C.S.J; ROHWER, E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. **Environ Pollut**. v. 199, p. 235- 243, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.030>