

LORRAN MIRANDA ANDRADE DE FREITAS

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA E INTERAÇÕES MOLECULARES DA
NITAZOXANIDA COM *Limnoperna fortunei***

Ouro Preto – MG, março de 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATIVIDADE MOLUSCICIDA E INTERAÇÕES MOLECULARES DA
NITAZOXANIDA COM *Limnoperna fortunei*

AUTOR: Lorrان Miranda Andrade de Freitas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

Ouro Preto – MG, março de 2018

F881a Freitas, Lorrán Miranda Andrade de .
Atividade moluscicida e interações moleculares da nitazoxanida com
Limnoperna fortunei [manuscrito] / Lorrán Miranda Andrade de Freitas. -
2018.
xiii, 73f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Mexilhão. 2. Proteômica. 3. Análise cromatográfica. 4. Mortalidade. I.
Andrade, Milton Hércules Guerra de. II. Universidade Federal de Ouro Preto.
III. Título.

CDU: 594.141

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 27 dias do mês de março do ano de 2018, às 13:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando Lorrان Miranda Andrade de Freitas, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Milton Hercules Guerra de Andrade (Presidente - UFOP), pelo Prof. Gustavo Henrique Bianco de Souza (Membro - UFOP), pelo Prof. Leonardo Maximo Cardoso (Membro - UFOP), pelo Prof. Mauro Cesar Isoldi (Membro - UFOP), pelo Prof. Sidney Augusto Vieira Filho (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando Lorrان Miranda Andrade de Freitas 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Atividade Moluscicida e Interações Moleculares da Nitazoxanida com *Limnoperna Fortunei*", na área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 27 de março de 2018.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Doutorando: _____

Esta pesquisa é resultado de um trabalho realizado no LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E PROTEÔMICA - ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

*Dedico esta dissertação a minha
família, que me fez acreditar que os
sonhos são para serem realizados.*

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica. Em especial, gostaria de destacar o papel fundamental do apoio familiar recebido durante toda minha caminhada neste maravilhoso campo acadêmico. Aos professores, meu muito obrigado por terem compartilhado seu conhecimento e, de maneira mágica, inspirado a busca do saber.

ÍNDICE

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
1. Introdução	2
1.1. Bioinvasão.....	2
1.2. <i>Limnoperna fortunei</i>	3
1.3. Formas de combate a infestação por <i>Limnoperna fortunei</i>	9
1.3.1. Métodos físicos.....	10
1.3.2. Métodos químicos.....	12
1.4. 2-acetolyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamide.....	13
2. Justificativa	16
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. Materiais e métodos	20
4.1. Ensaios de atividade moluscicida.....	21
4.2. Análise da expressão diferencial de proteínas.....	22
4.2.1. Extrato protéico de <i>Limnoperna fortunei</i>	22
4.2.2. Eletroforese SDS PAGE bidimensional.....	23
4.2.3. Análise das eletroforeses bidimensionais.....	23
4.2.4. Preparo de coluna de afinidade.....	23
4.2.5. Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B conjugada a NTZ.....	24
4.2.6. Eletroforese SDS PAGE unidimensional.....	24
4.2.7. Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	25
4.3. Ensaio de atividade da PFOR.....	25

4.6. Remoção do NTZ da água por adsorção em carvão ativado.....	26
4.7. Análise estatística.....	26
5. Resultados e discussão.....	27
5.1. Atividade de extratos de plantas e metais molucidas comparados ao NTZ.....	28
5.2. Ensaio de adsorção do NTZ em carvão ativado.....	33
5.3. Ensaio de atividade da piruvato ferredoxina oxirredutase (PFOR).....	36
5.4. Análise da expressão diferencial de proteínas de <i>Limnoperna fortunei</i> expostos ao NTZ.....	37
5.5- Imobilização de proteínas em coluna de afinidade de NTZ.....	39
5.6 – Caracterização da proteínas da coluna de afinidade de NTZ.....	41
5.7- Efeito do NTZ sobre a arginina quinase.....	49
6. Conclusões.....	52
7. Referências bibliográficas.....	54

RESUMO

O *Limnoperna fortunei* é responsável por impactos econômicos, principalmente no setor hidrelétrico responsável pela maior parte da produção de energia elétrica no Brasil. Atualmente o cloro é o agente mais empregado no combate às infestações pelo *L. fortunei*, entretanto, sua utilização é limitada pelas agências ambientais devido ao potencial tóxico. A substância 2-acetoxi-4-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamida (NTZ) induziu mortalidade de 80 a 60% em concentrações de 5 a 1 ppm respectivamente. Nessas concentrações, a droga possui baixa toxicidade em organismos superiores aeróbicos. Estudos em peixes demonstraram baixo potencial toxicológico, indicando que pode ser usada com segurança na dose 1 ppm. Visando alcançar melhor desempenho da droga e utiliza-la em menores concentrações, a amônia foi associada a 1 ppm para ampliar o efeito moluscicida do NTZ. Nossos resultados mostram uma potencialização do efeito e uma mortalidade de 80% com um dose 10 vezes menor associada a 1 ppm de amônia. A droga pode ser facilmente removida da água de descarte logo após o tratamento de tubulações, se recolhida em reservatório contendo 1% de suspensão de carvão ativado sob agitação. Essa suspensão remove pelo menos 99% de pulsos de concentrações de 5 ppm em 15 segundos de exposição. Além disso, a capacidade máxima de retenção do carvão atinge 10% do seu peso. Esse estudo traz como perspectiva imediata a criação de um sistema de fluxo contínuo de remoção do NTZ da água de rejeito e a possibilidade dispensa-la em águas fluviais sem causar danos ambientais. O NTZ foi imobilizado em Sepharose, com o objetivo de isolar e identificar as proteínas que interagem de forma específica ao NTZ. Empregando-se a espectrometria de massas foram identificadas algumas proteínas ligantes que foram analisadas como possíveis alvos de ação. A arginina quinase, considerada alvo de drogas antiparasitárias e enzima fundamental para a manutenção do organismo em anaerobiose, foi identificada na fração retida. Os resultados de ensaios enzimáticos demonstram que o NTZ inibe arginina quinase em concentrações molares de 10^{-4} M. Devido a importância dessa enzima e a possibilidade de acúmulo da droga durante a filtração de água realizada por esses organismos consideramos a possibilidade que esse mecanismo possa explicar o efeito tóxico do NTZ sobre o *L. fortunei*. Além disso, a interação entre a droga e proteínas envolvidas na regulação da apoptose também poderiam contribuir para essa atividade tóxica.

ABSTRACT

The *Limnoperna fortunei* is responsible for economic impacts, mainly in the hydroelectric sector responsible for most of the Brazil electricity production. Chlorine is currently the most widely used agent for controlling *L. fortunei* infestations, however, its use is limited by environmental agencies due to toxic potential. The substance 2-acetolyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamide (NTZ) induced mortality from 80 to 60% in concentrations of 5 to 1 ppm respectively. At these concentrations, the drug has low toxicity in upper aerobic organisms. Studies in fish have shown low toxicological potential, indicating that it can safely be used at the dose of 1 ppm. In order to achieve better performance of the drug and to use it at lower concentrations, ammonia was associated with 1 ppm to increase the molluscicidal effect of NTZ. Our results show potentiation of the effect and a mortality of 80% with a 10-fold lower dose associated with 1 ppm of ammonia. The drug can be easily removed from the wastewater soon after treatment of pipes if collected in a reservoir containing 1% activated charcoal suspension under agitation. This suspension removes at least 99% of pulses at concentrations of 5 ppm in 15 seconds of exposure. In addition, the maximum retention capacity of coal reaches 10% of its weight. This study has as an immediate perspective the creation of a continuous flow system for the removal of NTZ from waste water and the possibility to dispense it in river waters without causing environmental damages. NTZ was immobilized on Sepharose, in order to isolate and identify proteins that specifically interact with NTZ. Using mass spectrometry some ligand proteins were identified and analyzed as possible targets for action. Arginine kinase, considered a target of antiparasitic drugs and an enzyme essential for the maintenance of the organism in anaerobiosis, was identified in the retained fraction. Results from enzymatic assays demonstrate that NTZ inhibits arginine kinase at molar concentrations of 10^{-4} M. Due to the importance of this enzyme and the possibility of accumulation of the drug during the filtration of water performed by these organisms, we consider the possibility that this mechanism can explain the toxic effect of NTZ on the *L. fortunei*. In addition, the interaction between the drug and proteins involved in the regulation of apoptosis could also contribute to this toxic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mapa de ocorrência da presença de <i>L. fortunei</i> no Brasil (Adaptado de Uliano-Silva, et al., 2013).....	3
Figura 02: Estruturas presentes no <i>L. fortunei</i> (modificado de Morton, 1977).....	6
Figura 03: Gastos relativos relacionados a presença de <i>Dreissena polymorpha</i> nos EUA (Modificado de O'Neill, 1997).....	8
Figura 04: Trocador de calor de usina hidrelétrica (Zanella & Marenha, 2002).....	9
Figura 05: <i>L. fortunei</i> preparado para extração da região muscular (em branco).....	22
Figura 06: % de <i>L. fortunei</i> mortos após a exposição a diferentes concentrações de Sulfato de Cobre (Cu) e do fármaco Nitaxoxanide (NTZ) durante 24 horas em ambiente aerado com troca das soluções a cada 8 horas. N = 25.....	29
Figura 07: % de <i>L. fortunei</i> mortos após a exposição a diferentes concentrações de NTZ durante 3 tempos em ambiente aerado sem troca das soluções. N = 25.....	30
Figura 08: % de <i>L. fortunei</i> mortos após a exposição a diferentes concentrações do fármaco Nitaxoxanide (NTZ) em associação com amônia durante 3 tempos em ambiente aerado sem troca das soluções. N = 25.....	32
Figura 09: Valor relativo do total de NTZ presente nas frações de 5mL coletadas a partir de uma solução inicial contendo uma concentração de 10^{-4} M de NTZ, com limite de detecção de 10^{-5} M.....	34
Figura 10: Medidas da atividade enzimática de PFOR para extratos de <i>L. fortunei</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (controle). Relação entre unidades de absorvância (UA) e volume do extrato utilizado para o ensaio em microlitros.....	36
Figura 11: Eletroforese bidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida com isoeletrofocalização de 3-10 pH de 200 microgramas de extrato de <i>L. fortunei</i> controle.....	38
Figura 12: – Eletroforese bidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida com isoeletrofocalização de 3-10 pH de 200 microgramas de extrato de <i>L. fortunei</i> exposto a 1ppm de NTZ durante 24 horas.....	39
Figura 13: Eletroforese bidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida com isoeletrofocalização de 3-10 pH de 200 microgramas de extrato de <i>L. fortunei</i> exposto a 5ppm de NTZ durante 24 horas.....	40

Figuras 14: Eletroforese unidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida. (PPM) Padrão de Peso Molecular, (A) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-6} M, (B) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-6} M, (C) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-5} M, (D) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-5} M, (E) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-4} M, (F) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-4} M, (G) eluição com 5 mL de ácido salicílico 10^{-4} M, (H) eluição com 5 mL de ácido salicílico 10^{-4} M	40
FIGURA 15: Representação do ciclo de atividade da arginina quinase.....	49
FIGURA 16: Velocidade de degradação de NADH em nano moles/min pela atividade da arginina quinase em relação a diferentes concentrações de inibidor (NTZ) utilizado.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Classificação trófica do <i>Limniperla fortunei</i>	3
Tabela 02: Limites de diferentes parâmetros ambientais de suportados pelo <i>L. fortunei</i> (Adaptada de Darrigran, 2002).....	6
Tabela 03: Concentração molar de NTZ detectado nas frações coletadas após a concentração de 30 vezes do volume com limite de detecção de 10^{-5} M. n = 5.....	35
Tabela 04: Concentração molar de NTZ detectado nas frações coletadas após contato com solução de 1% de carvão ativado em três diferentes tempos a concentração de 30 vezes do volume com limite de detecção de 10^{-5} M. N = 5.....	36
Tabela 05: Proteínas identificadas por espectrometria de massas e caracterizadas por bioinformática utilizando as ferramentas InterPro, protonet, UniProt, SAAS annotation e BLAST após cromatografia de afinidade com NTZ.....	41

1. Introdução

1- Introdução

1.1- Bioinvasão

Uma espécie exótica (não nativa) pode ser considerada invasora quando entra em um novo ambiente e passa a dominá-lo, se reproduzindo de forma descontrolada, causando impactos econômicos, ambientais ou sociais (“Executive Order 13112 - National Invasive Species Council – EUA”).

Especificamente em ecossistemas de água doce, que possuem diversos tipos de detrimientos como poluição, esgotamento pela agricultura e desvios hidrológicos, existe um elevado risco a introdução de espécies bioinvasoras devido a sua exposição a diversos meios de transporte com diferentes origens ecológicas, sendo que estes podem auxiliar no sucesso da bioinvasão de novas espécies ao servirem como carreadores. (Dudgeon, 2006; Strayer, 2010; Gallardo & Aldridge, 2013; Anderson, 2015)

Uma das principais vias de disseminação de espécies bioinvasoras de água doce é através da água de lastro de navios mercantes que podem transpor distâncias continentais carregando espécies de peixes, crustáceos e plantas não nativas a sua destinação. Devido a elevada capacidade de algumas espécies de sobreviverem em condições extremas, as medidas de biossegurança atualmente adotadas não são completamente eficientes e sua utilização é pouco fiscalizada, como exemplo, a troca da água de lastro dos navios em alto mar.

Uma vez estabelecida a invasão, a erradicação dessas espécies é virtualmente impossível e medidas de controle possuem custos elevados. A prevenção da introdução inicial e disseminação é considerada a melhor estratégia para o controle de bioinvasões (Ludwig & Leitch, 1996; Buchan & Padilla, 1999; Pimentel, 1999; Johnson, *et al.*, 2001; Costello, *et al.*, 2007; Gates, *et al.*, 2008; Mahon, *et al.*, 2011; Stebbing, *et al.*, 2011; Stasko, *et al.*, 2012; Bacela-Spychalska, 2013; Ghabooli, *et al.*, 2013; Anderson, 2015). Ainda assim, apenas uma pequena quantidade de indivíduos não nativos que chegam a um novo ambiente são capazes de estabelecer populações e de se tornarem pragas disseminadas, sendo seu sucesso relacionado a sua plasticidade fenotípica (Pastorino, *et al.*, 1993). Sendo os bivalves um dos mais antigos e disseminados tipos de invertebrados, não é uma surpresa que algumas das espécies mais invasivas sejam desta taxonomia (Uliano-Silva, *et al.*, 2014).

No Brasil a NORMAM-20/DPC estabelece as diretrizes referentes a prevenção da poluição por parte das embarcações em Águas Jurisdicionais Brasileiras (AJB), em relação ao Gerenciamento da Água de Lastro. As normas ditam a obrigatoriedade da troca da Água de Lastro de acordo com a Convenção Internacional de Controle e Gestão da Água de Lastro e Sedimentos de Navios, adotada em fevereiro de 2004 e assinada pelo Brasil em 25 de Janeiro de 2005 e com a Resolução de Assembléia da Organização Marítima Internacional (IMO) A.868(20), de 1997. Entretanto as medidas tomadas vieram tarde, visto que a bioinvasão pelo *Limnoperna fortunei* já estava estabelecida no território nacional.

1.2- *Limnoperna fortunei*

O *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), da família *Mytilidae*, é um bivalve de água doce natural do suldeste Asiático e foi capaz de invadir múltiplos ecossistemas em Hong Kong, no Japão e na América do Sul, possuindo a capacidade de gerar danos ecológicos e econômicos similares ao *Dreissena polymorpha* na América do Norte e Europa (Miller & McClure, 1931; Darrigran & Pastorino, 1995; Sieracki, et al., 2014).

Classificação	
FILO	Mollusca
CLASSE	Bivalvia
SUBCLASSE	Pteriomorpha
ORDEM	Mytiloida
SUPERFAMÍLIA	Mytiloidea
FAMÍLIA	Mytilidae
GÊNERO	Limnoperna
ESPÉCIE	<i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker, 1856)

TABELA 1 – Classificação trófica do *Limnoperna fortunei*

Análises em escala global demonstraram que o *L. fortunei* possui a capacidade de colonizar a maior parte das águas da América do Sul assim como do Sul da América do Norte.

Com base em diversos parâmetros utilizados como pH, concentração de cálcio, temperatura da água, entre outras, o Brasil corre o risco de ter todas suas bacias hidrográficas, desde o sul até o extremo norte na região da Amazônia, infestadas por esta espécie bioinvasora (Ricciardi 1998; Kluza & McNyset, 2005; Boltovskoy, 2006; Karatayev, *et al.*, 2007; Oliveira, *et al.*, 2010)

Sua presença no continente sul americano foi reportada pela primeira vez em 1991, no estuário do rio La Plata na Argentina (Pastorino, *et al.*, 1993). Em 1994 foi identificado em Artilleros na costa do Uruguai. No caso do Brasil, é dito que a infestação ocorreu dois locais distintos na mesma época, em 1998, no rio Paraná no Mato Grosso do Sul, através da migração de peixes do rio La Plata assim como com o auxílio do tráfego de barcos rio acima. No mesmo ano, ocorreu a introdução no rio Jacuí, próximo a Porto Alegre, provavelmente através de água de lastro (Mansur, *et al.*, 1999). Atualmente o *L. fortunei* está presente em rios, lagoas e reservatórios de água de grande parte do sul e suldeste brasileiro. (Uliano-Silva, *et al.*, 2013).

Desde sua primeira aparição no continente sul Americano, foi calculado que a dispersão do *L. fortunei* atinge 240 km por ano correnteza a cima (Boltovskoy, 2006). Entretanto, aparentemente, sua dispersão na direção norte está limitada a cidade de Cáceres no pantanal brasileiro, a explicação mais aceita atualmente sobre o rompimento de sua disseminação são os ciclos de cheia e de vazão naturais do pantanal, onde o nível da água chega a 10% do volume total durante a estação seca, o que geraria condições inóspitas tais como alta temperatura e baixos níveis de oxigênio na água, que por sua vez dificultariam a fixação de populações de *L. fortunei* no local (Oliveira & Calheiros, 2000; Matsui, *et al.*, 2002; Oliveira, *et al.*, 2006).

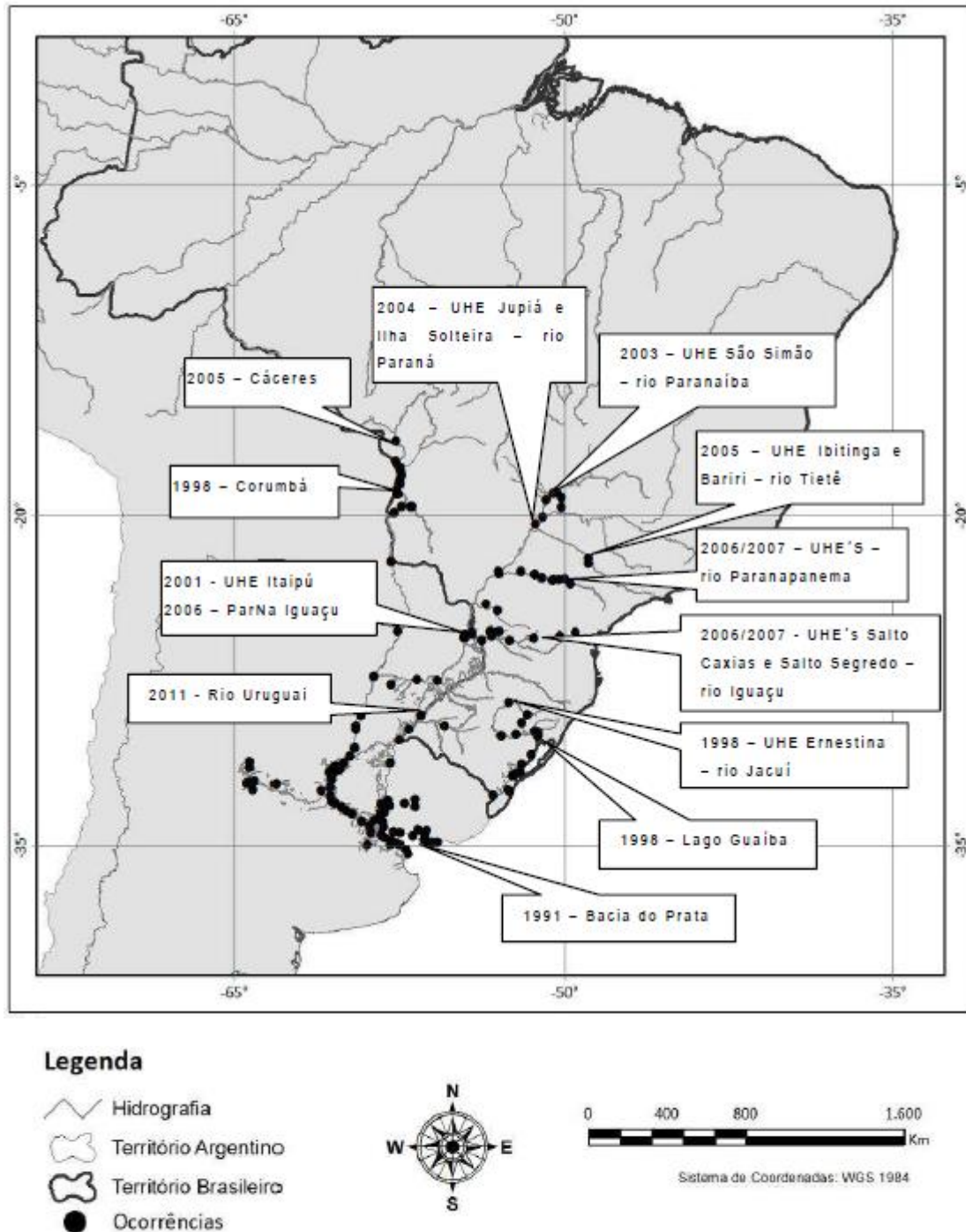


FIGURA 1 – Mapa de ocorrência da presença de *L. fortunei* no Brasil (Adaptado de Uliano-Silva, *et al.*, 2013).

O grande sucesso da invasão pelo *L. fortunei* está relacionado com sua alta capacidade de adaptação. Este, tende a se fixar em qualquer substrato sólido disponível através de seu bisco e possuem uma elevada taxa de proliferação, atingindo maturidade sexual com menos de 1 ano. Apesar de possuir uma expectativa de vida relativamente curta (2 a 3 anos), sua capacidade de formar agregados densos promove uma invasão exponencial. Em 1991, foram identificados 5

organismos/m² em rochas no rio La Plata em Bagliardi na Argentina, em 10 anos este número atingiu 150.000 organismos/m².

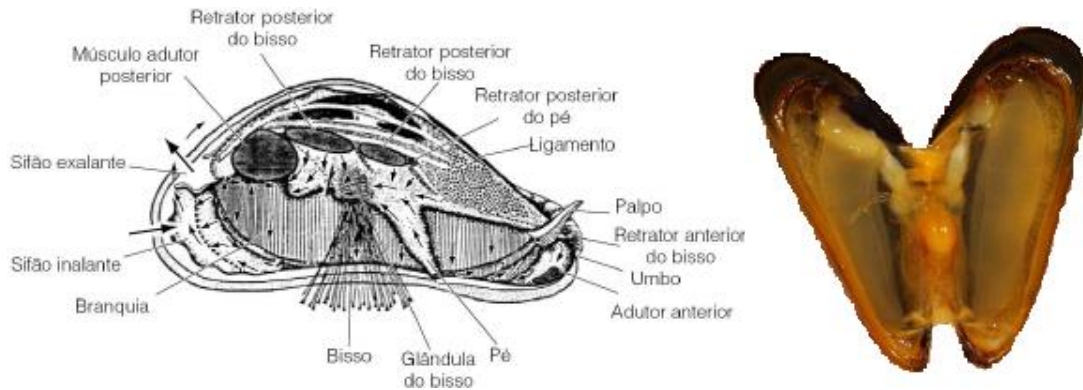


FIGURA 2 – Estruturas presentes no *L. fortunei* (modificado de Morton, 1977).

Além disso, sua fase larval planctônica, e o grande número de fibras bissais secretadas (>100), o auxiliam em seu deslocamento e em sua fixação em novos locais. Sua capacidade em habitar locais com baixos níveis de cálcio e de pH, e tolerância a grandes variações de temperatura (TABELA 2), elevam ainda mais sua capacidade de colonizar uma grande variedade de habitats. (Morton, 1977; Morton, 1982; Orensanz, *et al.*, 2002; Karatayev, *et al.*, 2007).

Parâmetro	Limites
Salinidade	0-12‰
Cálcio	3,96 mg/mL
pH	6,2 – 8,9
Temperatura desenvolvimento larval	16 – 28 °C
Temperatura sobrevivência do adulto	8 – 35 °C
Oxigênio	> 1,0 mg/L
Exposição ao ar	Até 7 dias

TABELA 2 - Limites de diferentes parâmetros ambientais suportados pelo *L. fortunei* (Adaptada de Darrigran, 2002).

Devido à similaridade ecológica entre o *L. fortunei* e o *Dreissena polymorpha*, existem predições de que eles possuam impactos semelhantes no ecossistema, sendo o último, atualmente, considerado o invasor mais agressivo de água doce do hemisfério norte. Diferentes

pesquisadores demonstraram seus impactos ecológicos, entre eles a alteração entre as interações tróficas e disponibilidade de comida para espécies bentônicas e da zona pelágica, além de alteraram os níveis de diversos outros nutrientes dissolvidos assim como de oxigênio (O'Neill, 1997; Karatayev, *et al.*, 2002; Mingyang, *et al.*, 2008).

No caso do *L. fortunei* na América do Sul, poucos estudos foram concluídos sobre os impactos ecológicos causados até o momento. Acerca de parâmetros abióticos, este é similar ao *Dreissena polymorpha* em suas taxas de filtração (200-300 mL/h⁻¹), desta forma eles elevam a transparência da água e conseqüentemente a penetração de luz, o que é prejudicial a algumas das espécies nativas, causam ainda a diminuição de matéria orgânica em suspensão além de elevarem as concentrações de nitrato, fosfato e amônia na água (Karatayev, *et al.*, 2007).

Em relação a alterações tróficas, pode se citar casos como os de peixes omnívoros como o Armado (*Oxydoras kneri*) e Pacu (*Prochilodus variegatus*), que passaram a consumir quase exclusivamente o *L. fortunei*, sendo descrito que todos os peixes capturados no rio La Plata continham *L. fortunei* em seu trato digestivo. Da mesma forma, foi descrito o aumento de duas a quatro vezes no número de peixes mortos atingindo as margens em locais de água doce na Argentina no período de 1992-1993 e 2000-2001, o que foi associado a introdução do *L. fortunei* ao habitat (Ferriz, *et al.*, 2000; Penchaszadeh, *et al.*, 2000; Cataldo, 2002).

Darrigran (2002), associou a presença de *L. fortunei* com o aumento da densidade de isópodes, anfípodes, oligoquetas, quironomídeos e turbelários. Mansur e colaboradores (1999), demonstram que o *L. fortunei* coloniza a carapaça de crustáceos e válvulas de mexilhões como do *Anodontites trapezeus* impedindo que esses abram suas válvulas seja para reprodução, alimentação ou mesmo respiração, eventualmente os levando a morte. Informações a respeito de parasitas e comensais envolvendo o *L. fortunei* não estão disponíveis até o momento.

Devido a fase larval planctônica, o *L. fortunei* possui a capacidade de colonizar rapidamente sistemas de captação de água municipais e industriais, mesmo os que utilizam de telas capazes de inviabilizar a entrada de adultos. Uma vez dentro dos canos o mexilhão inicia sua fixação inicial pelas fendas e articulações do sistema sendo capaz de colonizar posteriormente toda a superfície disponível levando a uma redução de fluxo inicial, podendo atingir o completo interrompimento do fluxo de água (Morton, 1977).

A limpeza destes sistemas condutores de água, além de complicada é custosa. Em 1995, Darrigran e Pastorino, reportam o primeiro caso de uma grande incrustação no sistema de captação de água de uma companhia de coleta de água para tratamento urbano da cidade de La

Plata (Argentina), sendo outros eventos semelhantes reportados concomitantemente no sistema de captação na cidade de Buenos Aires.

Entretanto, o maior impacto econômico gerado pela macro-incrustação de mexilhões é no setor de geração de energia como exemplificado na Figura 3. Em uma hidrelétrica com produção diária de 120 MW, com problemas de macro-incrustação em seu sistema de resfriamento (Figura 4), as perdas atingiriam a casa de dezenas de milhares de dólares ao dia. Tendo sido reportado casos como da hidrelétrica de Yaceratá (Argentina/Paraguai) que teve de desligar suas turbinas diversas vezes desde o início da colonização.

Após o relato de Yaceratá, os técnicos da hidrelétrica de Itaipú iniciaram um monitoramento extensivo para a detecção precoce da presença do *L. fortunei*. Em 2001, ocorreu a primeira detecção. Ao consideramos que mais de 80% da energia elétrica no Brasil é proveniente de fontes hidrelétricas, os prejuízos são incalculáveis (Darrigran, 2002, Zanella & Marena, 2002).

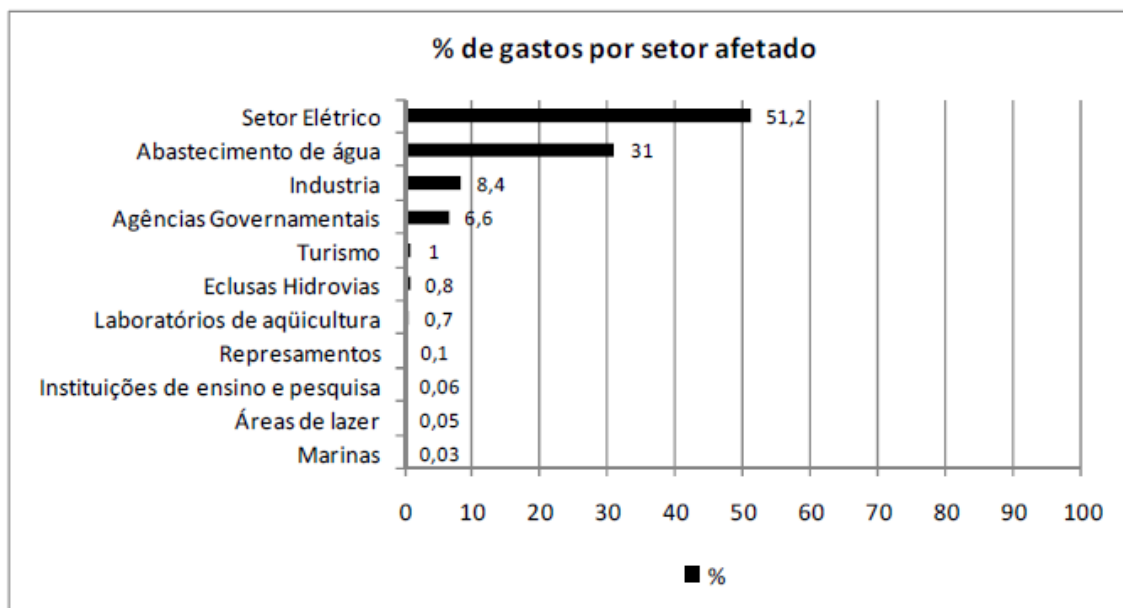


FIGURA 3 – Gastos relativos relacionados a presença de *Dreissena polymorpha* nos EUA (Modificado de Zanella & Marena, 2002).



FIGURA 4 - Trocador de calor de usina hidrelétrica (Zanella & Marenda, 2002).

Nesse contexto, diversos autores buscaram uma maneira de combater a infestação por *L. fortunei*, e diversas substâncias demonstraram eficiência em matar o mesmo, entretanto, geralmente seus mecanismos de ação assim como o seu impacto ambiental não foram bem compreendidos ou em alguns casos nem mesmo estudados. Ainda, métodos físicos para limpeza e manutenção de sistemas foram amplamente explorados por diversos autores como alternativa do tratamento químico atingindo graus variáveis de sucesso, porém, o tratamento químico continua sendo considerado o mais eficaz no combate a infestação por *L. fortunei*, enquanto métodos físicos são considerados apenas complementares.

1.3- Formas de combate a infestação por *Limnoperna fortunei*

O controle da infestação pelo *L. fortunei* e da minimização de seus impactos é complexo, sendo o grau de complexidade elevado proporcionalmente ao tempo gasto para implementar esses métodos. Até o presente momento não existe uma forma definitiva de combate à

infestação. As iniciativas que contam com controle biológico, seja pela introdução de predadores, competidores ou parasitos é altamente controversa, uma vez que a introdução de novas espécies ao ambiente pode, ao contrário do esperado, trazer ainda mais prejuízos ambientais e socioeconômicos. Assim, os métodos físicos e químicos são os mais recomendados. A utilização da pintura antincrustante é eficiente em determinados casos, principalmente levando-se em conta na instalação de novos locais, por outro lado, torna-se inviável no caso de instalações em funcionamento, visto que a troca ou substituição de tubulações e sistemas de captação de água é virtualmente impossível.

1.3.1- Métodos físicos

Os métodos físicos, apesar de não serem os mais efetivos, são considerados bons complementares a métodos químicos. Entre os métodos físicos melhor estudados encontram-se a radiação ultravioleta, o tratamento por meio de choque térmico, o tratamento através de descargas elétricas, magnetização da água, anóxia (diminuição na concentração de oxigênio) e hipóxia (ausência de oxigênio dissolvido na água) além dos métodos acústicos.

A exposição de organismos como cracas e outras formas de larvas a radiação ultravioleta demonstra uma redução do assentamento em tubos transparentes circulando água salgada (Homan, 1991; Preston, *et al.*, 1999). De acordo com Homan, 1991, o *Dreissena polymorpha* exposto a radiação ultravioleta possui uma atividade de incrustação reduzida, o que sugere um potencial para aplicação desse método. A grande desvantagem dessa técnica é o tempo elevado de exposição para que radiação ultravioleta tenha efeito, inviabilizando sua utilização em sistemas com grande vazão de água.

Claudi, 1995, demonstrou que o tratamento térmico pode ser empregado de forma eficiente, desde que a elevação da temperatura da água seja rápida, caso este aumento seja gradual, o molusco pode sofrer um processo de aclimatização, suportando temperaturas mais elevadas. O autor destaca que, para o *D. polymorpha*, 48 horas de exposição a 32°C é suficiente para sua morte, assim como uma exposição a 40°C durante 1 hora. No caso do *L. fortunei*, essas temperaturas devem ser desconsideradas devido a sua adaptação a climas tropicais, mas, ainda assim, o tratamento térmico poderia ser eficiente ao se elevar essas temperaturas. Entretanto, o problema deste método surge ao se descarregar a água tratada no ambiente, pois agências ambientais costumam regular a temperatura da água tratada a ser descarregada, fora o consumo

de energia para o aquecimento em sistemas de alta vazão e o tempo necessário para realização do tratamento.

Diferentes autores realizaram estudos de forma a determinar a eficácia da utilização de métodos elétricos no controle da incrustação de mexilhões no interior de equipamentos utilizados para captação de água de lagos e rios (Ostlie, *et al.*, 1994; Smythe, *et al.*, 1994; Smythe, 1995; Schoenbach, *et al.*, 1996; Smythe, *et al.*, 1996; Smythe, *et al.*, 1998). A principal discussão que os autores abordam sobre as vantagens deste método é a minimização de impactos ambientais quando comparado a métodos químicos de controle.

No geral, o método elétrico utiliza eletrodos imersos na água de forma a gerar um campo elétrico através da diferença de potencial elétrico. Os trabalhos desenvolvidos podem ser divididos em métodos de corrente contínua, que não apresenta muita eficácia devido a camada externa isolante presente em algumas larvas, ou de pulsos elétricos de alta potência (Smythe, 1995).

Resultados obtidos por diferentes autores, demonstram que o tratamento magnético pode ser utilizado em alguns casos específicos, como no tratamento de água em locais parados ou de baixa vazão, como no caso de navios cargueiros. Estes resultados indicam que o tratamento magnético causa a degeneração do tecido associado ao aparelho respiratório e outras estruturas relacionadas a alimentação, assim, como a diminuição da absorção de cálcio pelos organismos submetidos ao tratamento (Smythe, *et al.*, 1996; Ryan, 1997; Barnes, 1998).

Em relação aos métodos acústicos, o início dos estudos data da década de 70 na União Soviética, tendo como objetivo específico reduzir a incrustação em sistemas de refrigeração. O método empregado divide-se em três partes, cavitação, tratamento sonoro e vibração (Donskoy & Ludyanskiy 1995; Frenia, *et al.*, 1995; Donskoy, *et al.*, 1996; Bates, 2003; Mason, *et al.*, 2003). A cavitação, utilizando uma faixa de frequência contínua de 20 a 380 kHz, é capaz de matar 100% dos mexilhões zebra em experimentos laboratoriais, enquanto a vibração tem sido utilizada para evitar o incrustamento dos mexilhões adultos às estruturas. Foram desenvolvidos equipamentos específicos comerciais utilizados em embarcações (Bates, 2003) e também em usinas hidrelétricas (Donskoy, *et al.*, 1996), entretanto sua eficácia de fato é drasticamente reduzida quando comparada aos experimentos controlados.

O tratamento por anóxia é fatal para organismos aeróbicos e uma condição de hipóxia pode debilitar os organismos, tornando-os presas fáceis, prejudicando sua capacidade de reprodução e até mesmo levando-os a morte. Foi demonstrado que o *D. polymorpha*, exposto a condição de hipóxia, gerada pela gaseificação constante com N₂, em temperaturas superiores a

15°C, possui taxas consideráveis de mortalidade, sendo essa, diretamente proporcional a elevação da temperatura. Outro parâmetro levado em consideração é o tamanho do mexilhão, sendo que os moluscos menores necessitam de uma quantidade maior de oxigênio para sobreviver. Essa estratégia possui um tempo muito variado de exposição, de 5 a 800 horas, sendo inviável para utilização em sistemas de refrigeração (Matthews & McMahon, 1994; O'Neill & Charles, 1996; Mackie, 1995).

1.3.2- Métodos químicos

De maneira geral, os métodos físicos não substituem a utilização de métodos químicos. As ações que aplicam substâncias químicas para o combate e a prevenção da incrustação por *L. fortunei* e *D. polymorpha* são as que apresentam os melhores resultados, assim como o melhor custo benefício. A utilização de métodos físicos, como filtros, consideradas auxiliares, não são aplicáveis uma vez que esses não atingem os mesmos resultados quando exercitados em sistemas industriais, além de seu alto custo de implementação.

Entretanto, a utilização de agentes químicos não é amplamente empregada devido a fatores como incompatibilidade com os materiais presentes no sistema de resfriamento ou pelo possível impacto ambiental causado pela utilização de substâncias tóxicas com capacidade de poluir as águas a jusante da usina (Filippo, 2003; Kowalski & Kowalski, 2008).

Os métodos químicos mais comuns utilizam dióxido de cloro, dicloroisocianurato de sódio, hidróxido de sódio, sulfato de cobre e ozônio (Giordani, *et al.*, 2005). Devido ao baixo custo, assim como por possuir licenciamento para uso, o cloro é a substância mais comum no tratamento e prevenção da incrustação de *L. fortunei*, sendo que, sua utilização para o tratamento de água data do início do século XIX (Chambers, 1956; Meyer, 1994). Entretanto, a eficiência é relativamente baixa e os riscos ambientais são altos, uma vez que, altas concentrações e tempos prolongados de exposição são necessários para se obter a atividade desejada, e que a decomposição do cloro pode gerar compostos halogenados cuja toxicidade ambiental e a humanos é bem conhecida (Tominaga & Mídio, 1999; Antizar-Ladislao, 2008; Bergmann, 2010).

Além disso, o cloro pode reagir se combinando a substâncias como amônia e nitratos remanescentes gerando a formação de subprodutos, entre eles os trihalometanos, associados ao aumento do risco de câncer, problemas no sistema reprodutor e abortos espontâneos (Tominaga & Mídio, 1999).

De acordo com Claudi e Mackie (1994), os organismos aquáticos mais afetados são os peixes e fitoplânctons. Além de matar os organismos, o cloro pode alterar o comportamento, reprodução, crescimento e mutagênese dos organismos expostos. Devido a seu elevado poder oxidante, o cloro pode também levar a corrosão nos materiais presentes nos sistemas de resfriamento industriais, dependendo do tempo de exposição e da concentração, implicando também em impactos econômicos devido a sua ação corrosiva nos sistemas hidráulicos. Bivalves são capazes de perceber algumas substâncias tóxicas dissolvidas na água, entre elas o cloro, fazendo com que estes fechem suas válvulas, morrendo mais por asfixia e fome do que devido a exposição direta a estas substâncias (De Kock e Bowmer, 1993).

1.4- 2-acetolyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamide

2-acetolyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamide (NTZ) é um thiazol originalmente desenvolvido como um antihelmintico veterinário por Jean François Rossignol no Instituto Pasteur com efeitos cestocidas (Rossignol & Maisonneuve, 1984). Este consiste em uma porção nitrothiazol ligada a uma porção de ácido salicílico por uma ligação amida. Estudos em diferentes modelos indicam que as duas regiões do NTZ possuem atividades funcionais diferentes.

O grupamento nitro e a região nitrothiazol é responsável pela atividade contra parasitas extracelulares. Essa região também pode ser convertida em radical livre, que desencadeia eventos levando a morte celular ou a interferência nas vias de sinalização celular. O grupamento nitro está também envolvido na inibição da piruvato ferredoxina oxireductase (PFOR) encontrada em organismos anaeróbicos. Estudos com alguns patógenos indicam uma atividade de amplo espectro por meio de interferência em várias vias de sinalização (Fan-Minogue, *et al.*, 2013).

O NTZ foi planejado de forma a exercer uma atividade por meio de um mecanismo semelhante ao do metronidazol (MET). Após a administração da droga, MET é transformado em um composto ativo com a redução do grupo nitro por nitrorredutases (NRs), incluindo o sistema PFOR presente em muitos microorganismos anaeróbicos (Horner, *et al.*, 1999). A resistência encontrada contra MET está correlacionada com baixos níveis de atividade de PFOR em bactérias e parasitas, como *G. lamblia* (Dan, 2000) ou *Trichomonas vaginalis* (Samuelson, 1999; Rasololon, *et al.*, 2002; Dunne, *et al.*, 2003). Algumas destas estirpes resistentes à MET,

no entanto, ainda são sensíveis a outros nitroimidazóis (Megraud, *et al.*, 1998; Upcroft, *et al.*, 1999, Upcroft, *et al.*, 2006) e para NTZ (Adagu, 2002).

Embora estruturalmente semelhante aos análogos do MET, a redução do grupo 5-nitro no anel tiazol do NTZ não ocorre pela ação do metabolismo como nesse grupo de medicamentos. Desta forma, o efeito farmacológico do NTZ não está vinculado a essa alteração química (Broekhuysen, 2000; Anderson, 2015). O mecanismo de ação mais explorado pela literatura envolve o sequestro de elétrons na reação de desidrogenação do piruvato promovida pela PFOR. A interrupção dessa transferência de elétrons ao nível do cofator tiaminapirifosfato (TPP), impede a descarboxilação e produção de AcetilCoA. Além disso, o NTZ não é quimicamente modificado durante a reação enzimática, mas sofre protonação, podendo ser novamente utilizado após o equilíbrio (Hoffman, 2007).

In vivo, NTZ é rapidamente desacetilado e convertido em um composto de mesma eficácia e espectro de ação antiparasitários denominado tizoxanide (TIZ) (Broekhuysen, 2000; Adagu, 2002). No fígado, TIZ é conjugado com ácido glicurônico e excretados via biliar ou urina (Broekhuysen, 2000), a natureza iônica da forma ativa de NTZ e a sua capacidade captar prótons de reações enzimáticas podem ser responsáveis pela ampla gama de atividade relatadas para esta substância, sendo ainda que a resistência à NTZ não foi observada clinicamente e a partir de experimentos in vitro (Megraud, *et al.*, 1998).

Esta droga demonstrou um amplo espectro de atividade in vitro e in vivo contra diversos parasitas intestinais como *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, assim como diversas bactérias anaeróbicas que infectam animais e humanos (Adagu, 2002; Fox & Saravolatz, 2005).

Estudos em HCV sugerem que o NTZ exibe uma atividade anti-viral ao induzir PKR (proteína quinase ativada por RNA de cadeia dupla) a mediar a fosforilação de eIF2 α que por sua vez aumenta as defesas antivirais celulares (Elazar, 2009). Estudos com *Mycobacteria Tuberculosis* sugerem que NTZ inibe a via de sinalização de mTORC1, que é conhecido por regular a atividade de c-Myc. Outro estudo em macrófagos de camundongos demonstrou atividade inibidora de NTZ contra a produção de IL-6.

Em diferentes tipos de linhagens de células cancerígenas, a validação de NTZ revela uma alta eficiência para a inibição de c-Myc com uma IC50 variando entre 10 e 500nM, sendo sua administração oral em camundongos capaz de suprimir de forma significativa o crescimento do tumor pela inibição de c-Myc e indução de apoptose, o que sugere um potencial do NTZ

como uma nova droga antitumoral para inibição de c-Myc associada a neoplasia (Fan-Minogue, *et al.*, 2013).

2. Justificativa

2- JUSTIFICATIVA

O *Limnoperna fortunei* está estabelecido em várias regiões do país e, além disso, gera prejuízos em várias hidrelétricas brasileiras em decorrência da incrustação em sistemas hidráulicos. Nesse sentido, o desenvolvimento de estratégias para mitigar e prevenir a incrustação são fundamentais para redução do número de manutenções que ocasionam paradas da geração de energia.

3. Objetivos

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar substâncias potencialmente ativas na prevenção e controle da incrustação do *L. fortunei* e avaliar seus mecanismos de ação por meio de análises proteômicas.

3.2- Objetivos específicos

Realizar ensaios de atividade biológica no campo com *L. fortunei* em sistema isolado com água local para avaliação de possíveis agentes moluscicidas.

Investigar prováveis mecanismos de ação por meio da avaliação da expressão diferencial de proteínas a partir de abordagem proteômica em extratos de *L. fortunei* ao tratamento com moluscicida.

4. Materiais e Métodos

3- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Ensaios de atividade moluscicida

As análises de substâncias com potencial moluscicida ocorreram em dois locais, Barragem de Itaipú e Barragem de Igarapava. Todos os testes foram realizados sob aeração constante em triplicata técnica com $n=25$ por teste (n final = 75). Os *L. fortunei* foram selecionados após a coleta de forma aos testes conterem somente mexilhões adultos (maiores que 1 cm). Água local foi utilizada e o ensaio conduzido após 1 hora de ambientação em recipientes de plástico com volume de 1L de modo a minimizar o estresse do animal. O oxigênio dissolvido foi verificado a cada 6 horas e se manteve entre 5,4 e 5,5 ppm. O pH da água local variou entre os locais dos testes estando entre 7,8 e 8,2 em Itaipú e entre 8,3 e 8,7 em Igarapava dependendo da época em que os testes foram conduzidos. A temperatura da água se manteve entre 19 e 23,5°C em ambos locais. Os ensaios foram iniciados pela adição dos produtos a serem testados previamente diluídos em 100 mL de água local para um volume final de 1L.

Em Itaipú o tempo corrente foi de 24 horas com troca das soluções a cada 8 horas para renovação das substâncias com potencial moluscicida. A avaliação do íon cobre obtido a partir de sulfato de cobre, foi realizada para as concentrações finais de 10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M. Também foi avaliado um composto promissor dotado de atividade biocida mas muito bem tolerado por mamíferos denominado 2-acetolyloxy-N-(5-nitro-2-thiazolyl)-benzamide (NTZ) nas concentrações de $1,63 \times 10^{-6}$ M, $1,63 \times 10^{-5}$ M e $1,63 \times 10^{-4}$ M.

Afim de explorar os resultados obtidos, novos ensaios foram realizados na barragem de Igarapava com a NTZ em uma maior abrangência de concentrações assim como sua associação com 1ppm de amônia. Estes ensaios ocorreram sem a renovação das soluções de forma a analisar sua atividade com decaimento natural.

4.2- Análise da expressão diferencial de proteínas

Devido aos resultados satisfatórios obtidos com a NTZ, foram selecionadas duas concentrações, 2 ppm e 5 ppm, para determinação do proteoma dos mexilhões expostos a fim de se explorar possíveis mecanismos envolvidos em sua atividade no *L. fortunei*.

4.2.1- Extrato proteico de *Limnoperna fortunei*

De forma a minimizar a presença de interferentes os extratos foram realizados apenas com seções musculares dos mexilhões coletadas diretamente no local dos testes como é exemplificado na figura 5.

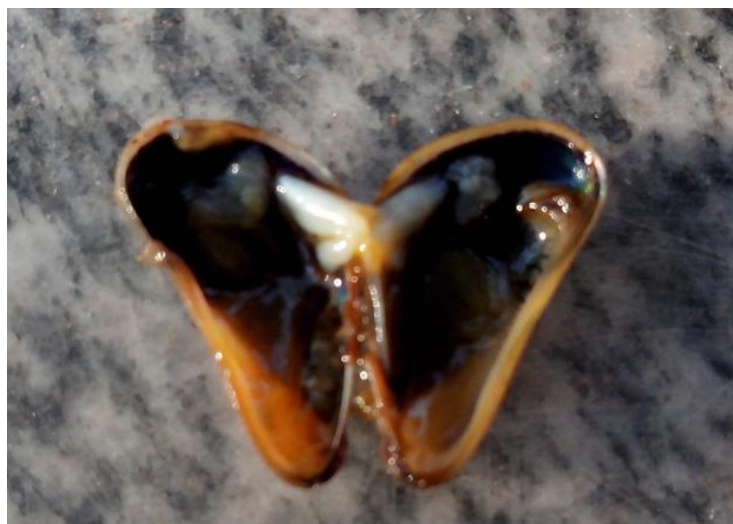


FIGURA 5 - *L. fortunei* preparado para extração da região muscular (em branco).

O tecido coletado de nove mexilhões vivos até o final dos ensaios foi acondicionado em microtubos contendo coquetel de inibidor de proteases (PIC) e imediatamente congelados. Para a extração, o tecido foi homogeneizado em tubo Potter's durante 10 minutos em banho de gelo contendo tampão tris HCl 25 mM pH 7,5, 1 μ M de PIC, 1mM de DTT (ditiotretol) e 1% de glicerol na proporção 1mL/100g de tecido. O homogenato foi submetido a sonicação durante três ciclos de 20 pulsos em banho de gelo. Após a sonicação, o tecido foi centrifugado a 40.000g a 4°C durante 2 horas e meia e precipitado por TCA/Acetona overnight a -20°C. Após a precipitação a amostra foi novamente centrifugada a 18.000g durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com 1 mL de acetona e centrifugado novamente nas condições anteriormente descritas. O pellet foi ressuspenso em água ultra pura e dialisado contra 0,01 M de carbonato de amônia durante 24 horas em membrana de diálise com corte

molecular de 8.300 KDa. Após a diálise a amostra foi liofilizada, ressuspensa em água ultra pura e sua concentração dosada por BCA (Thermo Scientif, EUA), segundo recomendações do fabricante.

4.2.2- Eletroforese SDS PAGE bidimensional

Cerca de 200 µg de proteína, enriquecida de acordo com o item anterior, foram submetidas a eletroforese SDS PAGE 2D. A eletrofocalização foi realizada em uma strip pH 3-10 não linear reduzida com 1% de DTT e alquilada com 4% de iodoacetamida após a isoeletrofocalização. A segunda dimensão foi realizada na concentração de 12,5% de poliacrilamida. Foi utilizado como padrão de peso molecular o *Molecular Weight Marker Kit* (Sigma Aldrich, EUA). A voltagem utilizada foi de 50 mV por gel. Após a corrida os géis foram corados pela técnica de comassie coloidal.

4.2.3- Análise das eletroforeses bidimensionais

A análise dos géis foi realizada de forma macroscópica com o objetivo de garantir a existência de diferença visível entre os grupos teste e controle. A análise quantitativa da diferença de expressão e a identificação das proteínas será realizada por espectrometria de massas através da técnica de shotgun.

4.2.4- Preparo de coluna de afinidade

Para auxiliar na busca por um possível mecanismo de atividade do NTZ no *L. fortunei*, foi realizado o acoplamento de NTZ em Sepharose 4B e o extrato do grupo controle (não tratado) foi passado pela coluna para determinar os ligantes da substância. Para isso, 4mL de Sepharose 4B foi lavada e secada à vácuo e ressuspensa em 20 mL de NaOH 0,4 M com 5% de epicloridrina a 40°C sob agitação constante durante 2 horas. A resina foi lavada em sequência com 1 L de água destilada, 50 mL de NaOH 0,4M, 1 L de água destilada e ressuspensa em 8mL de tampão carbonato 0,2M pH 12. Foram adicionados 30mg/mL de NTZ para reação overnight a 40°C sob agitação constante. A resina foi então lavada com 1L de água destilada e ressuspensa com 10 mL de etalonamina 1M, pH 9 e mantida a 40°C overnight sob agitação

constante sendo novamente lavada com 1L de água destilada para acondicionamento. Todos os passos descritos foram realizados com ausência de luz a partir da adição da droga.

4.2.5- Cromatografia de afinidade com coluna de Sepharose 4B conjugada a NTZ

1 mL da resina foi lavada inicialmente com 1L de NaCl a 0,3M e equilibrada com 200mL de tampão salina fosfatada. 2mL do extrato de *L. fortunei* obtido de acordo com o item 4.2.1 na concentração de 10mg/mL foi mantido em contato com a coluna durante 10 min, a coluna foi então lavada com 100mL de tampão salina fosfatada. Após a lavagem a coluna foi eluída com 10mL de NTZ em tampão salina fosfatada nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M e com 10mL de ácido salicílico a 10^{-4} M. A coluna foi lavada com 1L de NaCl 2M para armazenamento e o eluato dialisado contra acetato de amônia 0,01 M. O volume obtido foi liofilizado e submetido a análise por eletroforese SDS PAGE unidimensional e posteriormente analisado em espectrômetro de massas.

4.2.6- Eletroforese SDS PAGE unidimensional

O eluato obtido no item anterior foi submetido a eletroforese SDS PAGE unidimensional de acordo com Laemmli (1970), com gel de separação a 12,5% de poliacrilamida e gel de concentração a 5% em condições desnaturantes. As amostras foram diluídas em 10 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%, azul de bromofenol 0,002%) e desnaturadas com banho de água fervente durante 1 minuto. Foi utilizado como padrão de peso molecular o *Molecular Weight Marker Kit* (Sigma Aldrich, EUA). Foi adotada a amperagem de 20 mA por gel. Após a corrida em tampão Tris-HCl (25 mM, glicina 0,19 M e SDS 0,1%), o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 0,025% em 40% de etanol e 7% de ácido acético.

4.2.7- Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Cerca de 3µg de proteína foram injetadas no cromatógrafo de alta eficiência UntiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com um nano-trap C18 Acclaim PepMap100 (75 µm × 2 cm, 3 µm, 100 Å; Thermo Scientific) e uma coluna C18 RSLC Acclaim PepMap100 (75 µm × 15 cm, 2 µm, 100 Å; Thermo Scientific). Os peptídeos retidos foram eluídos em gradiente com os solventes (A) Água com 0,1% (V/V) de ácido fórmico e solvente (B) 80% (V/V) ACN, 20% (V/V) de água e 0,08% ácido fórmico. Foi adotado o gradiente de 4% de solvente (B) tempo 0, 20% solvente (B) tempo 10 min, 50% solvente (B) 30 min, 96% solvente (B) 35 min e retornando à 4% de solvente (B) em 50 min. A separação dos peptídeos foi realizada a 40°C. Após a separação, os peptídeos foram enviados ao espectrômetro de massas Q-exactive, Thermo Scientific. A amostra foi ionizada por uma fonte nanospray (eletrospray manométrico), por meio de uma agulha (emitter) de aço, aplicando-se uma voltagem de 2-3kV, em modo positivo e com a temperatura do capilar de 250 graus Celsius. As varreduras de MS1 foram realizadas com uma resolução de 70.000 e com tempo de injeção de 100ms e janela de detecção de 300-2000 m/z. Ions específicos foram fragmentados em uma cela via HCD (high collisional dissociation) utilizando N2 com uma energia de colisão de 30V. para a aquisição de espectros MS2 foi adotada uma resolução de 17500 e com tempo de injeção de 150ms. Para as demais análises, o Software Proteome Discovery v 1.4 (Thermo Scientific) foi adotado, incluindo algoritmos para combinar resultados de MS1 e MS2 com o banco de dado SequestHT. Os peptídeos identificados foram ser agrupados em graus de confiança, refinando o resultado, sendo confrontados com o banco de dados para oferecer informações sobre as possíveis proteínas contidas nas amostras. As análises dos grupos tratados e controle serão analisados com método idêntico logo após os problemas técnicos do equipamento serem solucionados.

4.3- Ensaio de atividade da PFOR

Os ensaios enzimáticos para PFOR foram conduzidos de acordo com Hoffman (2007), com algumas modificações. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu duplo feixe. Todas as reações foram conduzidas sobre condições anaeróbicas após borbulhamento com N₂. O tampão para as reações possui 100 mM fosfato de sódio (pH 7.4), 10 mM piruvato de sódio, 5 mM de benzyl viologen (BV; ε = 9.2 mM⁻¹ cm⁻¹ at 546 nm), 0.18

mM CoA, 1 mM MgCl₂ e 5 μM TPP. A reação foi iniciada pela adição da enzima e a redução de BV monitorada no comprimento de onda de 546 nm. Foi utilizado um extrato de *Saccharomyces cerevisiae* nas mesmas condições do item 4.2.1 como controle para PFOR. A concentração proteica das amostras foi determinada pela técnica de BCA.

4.4- Remoção do NTZ da água por adsorção em carvão ativado

Inicialmente, uma coluna de carvão ativado contendo 300 mg de carvão foi montada em lâ de vidro. 480mL de solução contendo NTZ a 10⁻⁵ M foi passada a 0,25 mL/min para a avaliação da capacidade de retenção da coluna sendo coletadas frações de 30 mL que foram posteriormente liofilizadas e ressuspendida em 1 mL de Tris HCl 0,15M pH 8,8. Posteriormente, em uma nova coluna, foram passados 3L da solução de NTZ a 10⁻⁴ M para a avaliação da condição de saturação da coluna, foram coletadas frações de 5 mL e as amostras foram mantidas em pH 8,8 pela adição de tampão Tris HCl para se obter a concentração final de 0,015M. Em um segundo momento foi realizado ensaio de adsorção por bath. Para isso, uma solução de 1 L de carvão ativado a 1% foi mantida sob agitação constante e NTZ foi adicionado para uma concentração final de 10⁻⁴M. Frações de 2 mL foram coletadas após 10 minutos, 1 minuto e 15 segundos de contato e filtradas em papel em ensaios independentes com n=6 sendo o pH das frações ajustado para 8,8. As concentrações foram determinadas a partir da curva de calibração e leituras obtidas no comprimento de onda de 418 nm.

4.6- Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GrafPad Prism 5.0®. Para as taxas de mortalidade foi considerado a média dos valores de mortalidade das triplicadas e realizado o teste two-way ANOVA para determinação da correlação entre os resultados.

5. Resultados e Discussão

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Atividades moluscidas

O cobre é um conhecido moluscicida cuja concentração máxima na água é controlada por agências de regulação ambiental sendo considerado um dos fatores de risco presente em águas poluídas. Testes de atividade demonstram uma toxicidade entre 1 e 100 mg/L (1 e 100 ppm) de DL50 para a maioria das espécies de moluscos aquáticos após 24 horas de exposição (Wang, *et al.*, 2013).

O cobre causou aproximadamente 24% de mortalidade no *L. fortunei* na concentração de 10^{-5} M (29 ppm de íon cobre) (Figura 6). Esse resultado ilustra que esse metal possui atividade moluscicida em concentrações elevadas, em concordância com a literatura. A agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (U.S. Environmental Protection Agency), no Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através da Resolução nº 357/2005 limita a quantidade de cobre dissolvido na água a 0,009mg/L. Por essa razão os ensaios com cobre serviram apenas com referência de moluscicida no presente trabalho.

A atividade do NTZ foi de aproximadamente 96% de mortalidade na concentração de $1,63 \times 10^{-5}$ M (5 ppm). Essa atividade foi três vezes maior em 5 ppm que a do cobre na concentração de 29 ppm. Em concentração 0,5 ppm o NTZ se equipara sem diferenças estatísticas em atividade ao cobre a 29 ppm demonstrando uma atividade 10 vezes maior do NTZ em relação ao cobre.

A atividade do NTZ foi explorada comercialmente no tratamento de gastroenterites virais, helmintíases, amebíases, giardíases e criptosporidíase, como discutido item 1.4. A escolha como substância com potencial atividade moluscicida se apoiou na proximidade filogenética entre platelmintos, nematelmintos e moluscos, além do amplo espectro de atividade apresentado por esta substância. A ausência de referencial bibliográfico sobre a atividade dessa droga em moluscos deixa claro que os resultados aqui apresentados são inéditos. Devido à elevada atividade do NTZ, estudos subsequentes foram realizados visando o aprofundamento da investigação a respeito mecanismo de ação e desenvolvimento de uma possível aplicação.

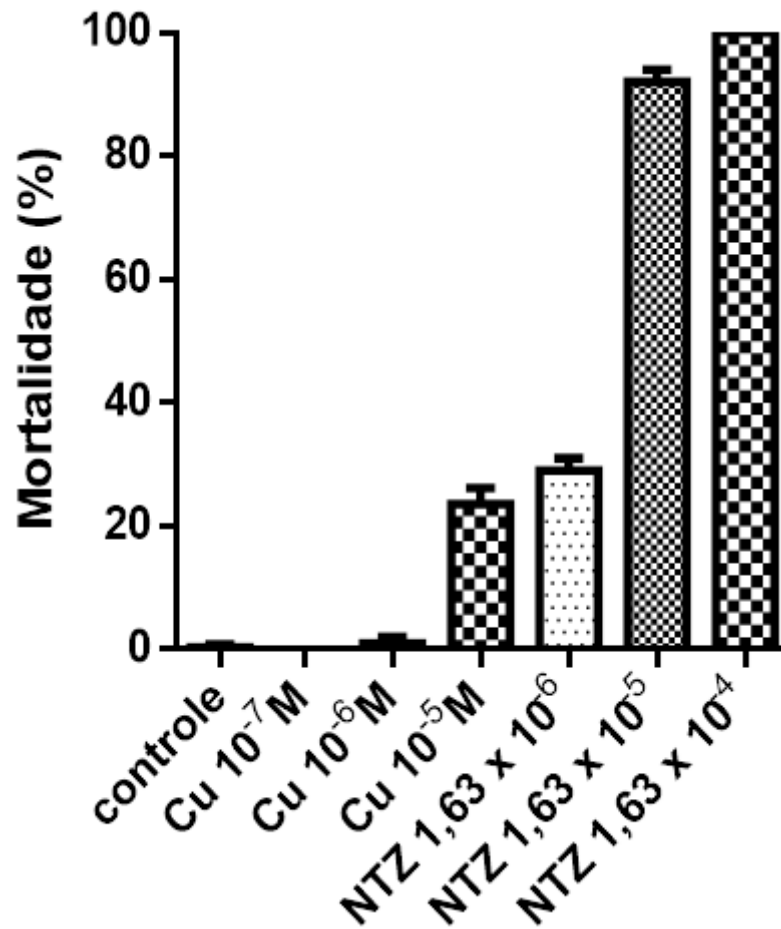


FIGURA 6 – % de *L. fortunei* mortos após a exposição a diferentes concentrações de Sulfato de Cobre (Cu) e do fármaco Nitaxoxanide (NTZ) durante 24 horas em ambiente aerado com troca das soluções a cada 8 horas. N = 25.

Para avaliar atividade do NTZ em condições brandas, novos testes foram conduzidos com uma população diferente de *L. fortunei*, originários do Rio Grande na Usina de Igarapava. Os ensaios foram realizados, logo após a coleta, com água local, sob aeração e sem renovação das soluções ao longo da exposição (Figura 7).

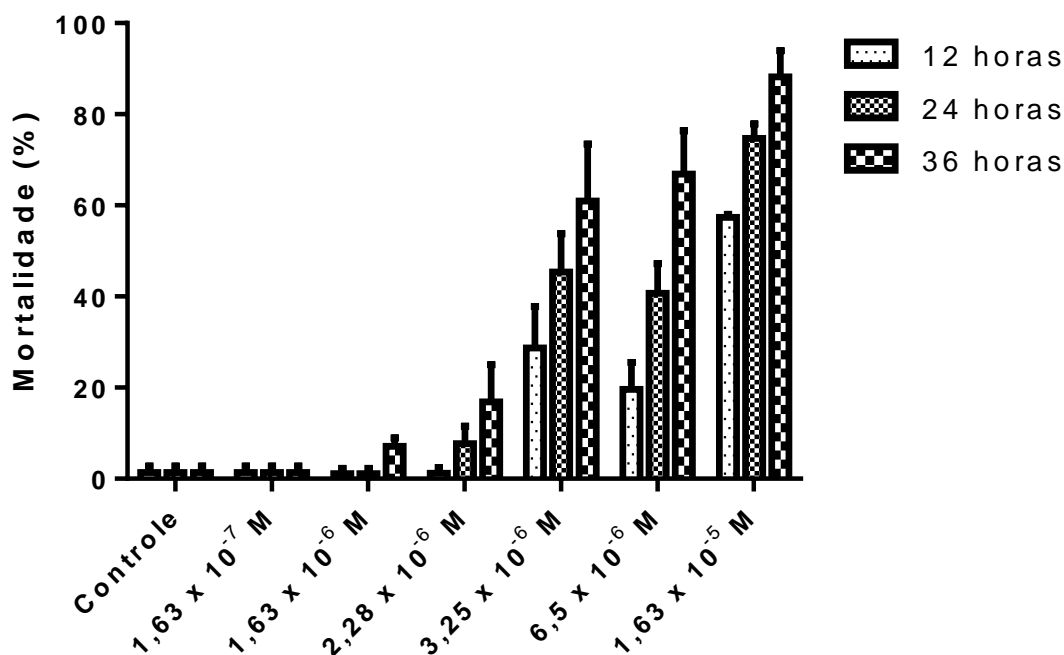


FIGURA 7 – % de *L. fortunei* mortos após a exposição a diferentes concentrações de NTZ durante 3 tempos em ambiente aerado sem troca das soluções. N = 25.

Conforme pode ser observado na Figura 7, uma expressiva atividade do NTZ surge a partir da concentração de $3,25 \times 10^{-6}$ M atingindo mortalidade próxima do valor máximo a $1,63 \times 10^{-5}$ M. Os resultados diferem ligeiramente daqueles apresentados na Figura 6 com *L. fortunei* originários de Itaipu em Foz do Iguaçu com a troca periódica da solução de NTZ durante a exposição à droga. Claramente é notado o efeito dependente da dose e do tempo de exposição e que a partir de 24 horas de exposição se obteve maior mortalidade em relação ao tempo de 12 horas.

Visando alcançar melhor desempenho da droga e utiliza-la em menores concentrações, a amônia foi associada a 1 ppm para ampliar o efeito moluscicida do NTZ. De acordo com Montresor, 2013, a amônia exerce efeito moluscicida em *L. fortunei* cultivado em laboratório. Nossos resultados mostram uma mortalidade inferior a 20% dos mexilhões expostos a $5,87 \times 10^{-6}$ M de NH_4OH (1 ppm). A baixa mortalidade em relação ao trabalho de Montresor, 2013, que verificou uma LC50 em 24 horas de exposição na concentração de 0.58 ppm, pode estar relacionada a uma resposta específica da população de mexilhões de Igarapava ou às condições especiais do ensaio realizado no campo em grupos de moluscos mantida com a água local sob adequada aeração e minimamente submetidos ao estresse. Considerando que não ocorre

alteração do pH da água local observada após a adição da amônia a 1 ppm, o efeito tóxico observado tem relação intrínseca a ação tóxica da própria espécie química.

Uma vez que moluscos possuem uma alta sensibilidade a substâncias tóxicas dissolvidas na água, fechando suas válvulas e causando uma situação de anaerobiose, a amônia presente em solução altera o comportamento normal desses animais os levando a um estado de estresse metabólico (De Kock & Bowmer, 1993). Além disso, a eliminação de amônia nesses animais ocorre na forma de ureia que é o principal produto de excreção do excesso de nitrogênio proveniente do catabolismo dos aminoácidos pelo ciclo arginina-ornitinauréia (OUC). Este ciclo apresenta quatro passos enzimáticos onde, inicialmente, a ornitina recebe o grupo carbamila do fosfato e forma a citrulina com liberação de fosfato inorgânico, sendo a catálise realizada pela enzima ornitina-transcarbamoilase. Um segundo grupo amido, originado do aspartato, é adicionado à citrulina, formando argininosuccinato após a catálise pela enzima citosólica arginino succinato sintetase com consumo de ATP. O argininosuccinato é degradado por uma argininosuccinase, liberando arginina e fumarato. A enzima citosólica arginase hidrolisa a arginina, formando ornitina e uréia.

Como pode ser apreciado na figura 8, comparando-se com a figura 7, foi possível associando-se ao tratamento 1 ppm de amônia reduzir 10 vezes a concentração de NTZ para se obter a mortalidade próxima de 80%. A dose de $1,63 \times 10^{-6}$ M de NTZ produziu mortalidade de apenas 10% isoladamente, mas associada a amônia a 1 ppm de amônia atingiu 80% dos indivíduos. A associação potencializa o efeito do NTZ gerando uma resposta maior do que o somatório das respostas individuais.

Em outras faixas de concentração também foi observado a potencialização do efeito: o tratamento com $1,63 \times 10^{-7}$ M de NTZ a mortalidade foi praticamente nula após 36 horas de exposição. Com a associação $1,63 \times 10^{-7}$ M de NTZ e 1 ppm de amônia observa-se 40% de mortalidade após 36 horas de exposição.

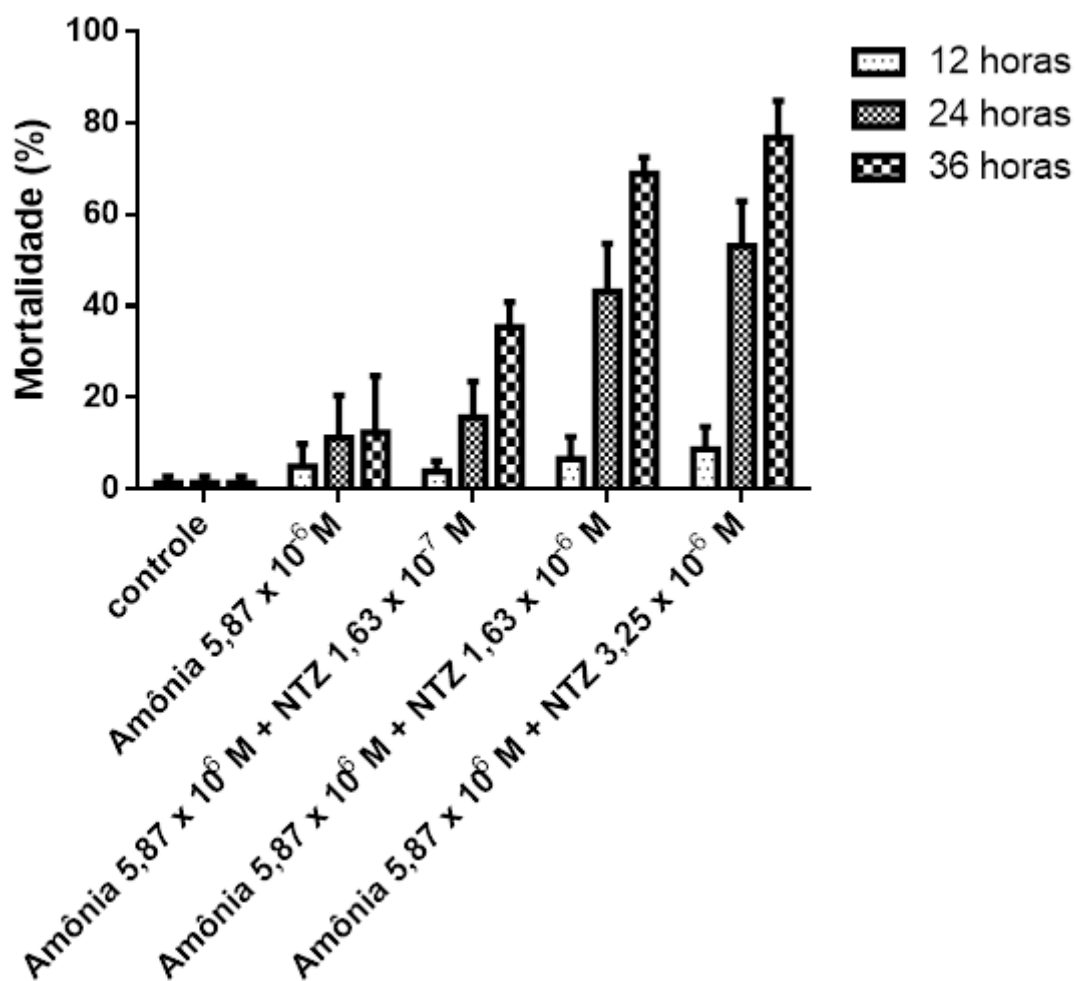


FIGURA 8 – % de *L. fortunei* mortos após a exposição a diferentes concentrações do fármaco Nitaxoxanide (NTZ) em associação com amônia durante 3 tempos em ambiente aerado sem troca das soluções. N = 25.

A amônia está presente naturalmente na água como produto da degradação de compostos orgânicos e inorgânicos do solo e da água, resultado da excreção da biota, redução do nitrogênio gasoso da água por micro-organismos ou por trocas gasosas com a atmosfera. A amônia é, também, constituinte comum no esgoto sanitário, resultado direto de descargas de efluentes domésticos e industriais, da hidrólise da ureia e da degradação biológica de aminoácidos e outros compostos orgânicos nitrogenados. De acordo com a resolução CONAMA 357/2005 a concentração permissível de nitrogênio amoniacal total é de 1,0 mg/L, para faixa de pH entre 8,0 e 8,5 para águas doces usada no abastecimento para consumo humano, de proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e aquicultura e pesca. A utilização de NTZ para tratamento e controle da infestação por *L. fortunei* em plantas industriais possui uma elevada aplicabilidade uma vez que esse é

utilizado para o tratamento de diversas parasitoses humanas assim como em peixes. A posologia indicada para humanos é de 500 mg duas vezes ao dia, sendo o tempo do tratamento variado para diferentes parasitoses (Rossignol & Maisonneuve, 1984; Megraud, *et al.*, 1998; Horner, *et al.*, 1999; Samuelson, 1999; Upcroft, *et al.*, 1999; Dan, *et al.*, 2000; Adagu, 2002; Rasoloson, *et al.*, 2002; Dunne, *et al.*, 2003; Upcroft, *et al.*, 2006; Fan-Minogue, *et al.*, 2013). Em peixes, Sutili e colaboradores, 2013, utilizaram o NTZ com sucesso para o tratamento dos patógenos *Ichthyophthirius multifiliis* e *Aeromonas hydrophila* em peixes-gato prata (*Rhamdia quelen*) com de 1mg/L na água por 48 horas. O mesmo autor determina que apenas em uma concentração de 3mg/L (3 ppm), provocam mortalidade de 20%.

5.2 – Ensaio de adsorção do NTZ em carvão ativado

Considerando que os agentes propostos para o tratamento de infestações por *L. fortunei* em plantas industriais seriam utilizados em baixas as concentrações, e que os sistemas hidráulicos fechados dos trocadores de calor apresentam vazões desprezíveis em relação aos rios, espera-se que o impacto ambiental seja muito reduzido. A dose moluscicida de NTZ associado à amônia, com 80% de eficiência é três vezes menor do que a dose terapêutica citada acima para peixes. Mesmo assim, visando remover o NTZ da água de descarte, foi avaliada a possibilidade do clareamento da solução de NTZ com carvão ativado. A capacidade de adsorção da droga pelo carvão foi avaliada por três abordagens

- Teste de adsorção em fase estacionária de carvão para avaliar a capacidade de retenção em baixo fluxo de solução de NTZ a 10^{-4} M e retenção em colunas de dimensões maiores.

Uma solução de NTZ a 10^{-4} M foi bombeada a um fluxo de 0,25 ml/min para uma coluna cromatográfica com 300 mg de carvão ativado. Após a passagem de aproximadamente 1L de solução (Figura 9), o eluato começa a apresentar leve coloração amarela que foi monitorada a 418 nm. A figura 10 apresenta os resultados como percentagem da concentração original recuperada após a adsorção. Considerou-se para efeito de cálculo da capacidade de retenção o volume de solução de NTZ até o início de aparecimento de absorções a 418 nm maiores que 0,010. Desta forma, como a mudança na absorção ocorre após a passagem de 1L de solução, a

massa de NTZ retida foi estimada em 30,7 mg. Essa capacidade corresponde a um desempenho excepcional que é equivalente a 10% do peso do adsorvente. Além dessa avaliação, foram realizados testes de adsorção em coluna contendo 1 Kg de carvão ativado empregando-se um fluxo de 350 ml/min. O tratamento resultou na remoção capaz de clarear 100% de 25L da solução de NTZ a 10^{-4} M cuja absorvância em pH 8,8 apresentava valor igual a 0,215

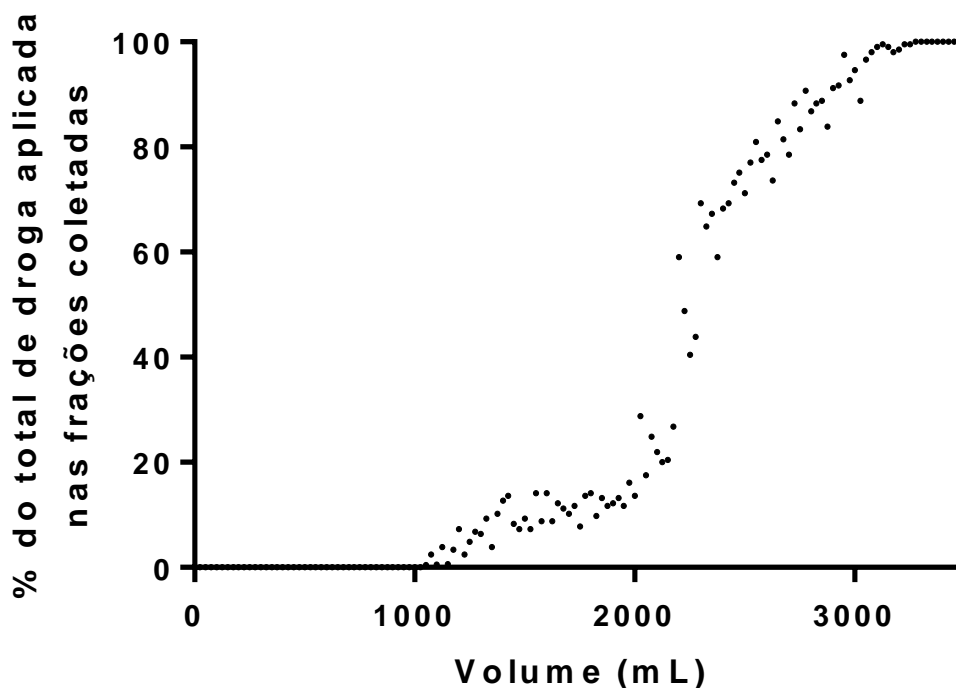


Figura 9 – Concentração relativa a 10^{-4} M de NTZ presente nas frações de 5mL coletadas a partir de uma solução inicial contendo uma concentração de 10^{-4} M de NTZ, com limite de detecção de 10^{-5} M.

- Teste de adsorção em fase estacionária de carvão para avaliar a capacidade de clareamento de solução de NTZ a 10^{-5} M

Uma solução de 10^{-5} M de NTZ foi introduzida em uma coluna de 300mg de carvão ativado com intuito de se avaliar se ocorreria adsorção do composto pela coluna nessas condições. Aplicou-se 480 mL da solução de 10^{-5} M de NTZ na coluna sob o fluxo de 0,25mL/min. Foram coletadas frações de 30 mL que foram liofilizadas e posteriormente ressuspensas em 1mL de Tris HCl 0,015 M pH 8,8. A medida da absorção a 418 nm demonstrou a remoção completa do NTZ conforme apresentado na Tabela 3. Esse resultado

permite concluir que há pelo menos uma redução de 30 vezes da concentração inicial da solução, considerando o limite de detecção do ensaio.

Fração coletada (30mL) ressuspensa em 1mL de Tris HCl 0,015 M pH 8,8	Leitura a 418 nm
1	0
4	0
8	0
12	0
16	0

TABELA 3 – Concentração molar de NTZ detectado nas frações coletadas após a concentração de 30 vezes do volume com limite de detecção de 10^{-5} M. n = 5.

- Clareamento em pequenos intervalos de tempo da solução de NTZ a 10^{-4} M em batelada com suspensão de carvão a 1%

Uma solução de 200 mL de carvão ativado a 1% foi mantida sob agitação constante e acrescida de pulsos de 30,7 mg de NTZ obtendo-se com a essa adição solução em concentração final de 10^{-4} M. Alíquotas de 2 mL foram retiradas nos tempos de tratamento de 10 minutos, 1 minuto e 15 segundos e imediatamente filtradas em papel de filtro repetindo-se o experimento cinco vezes em cada tempo. A medida da absorção a 418 nm demonstrou a remoção completa do NTZ conforme apresentado na Tabela 4.

Tempo de coleta das frações	Leitura a 418 nm
10 minutos	0
1 minuto	0
15 segundos	0

TABELA 4 – Concentração molar de NTZ detectado nas frações coletadas após contato com solução de 1% de carvão ativado em três diferentes tempos a concentração de 30 vezes do volume com limite de detecção de 10^{-5} M. N = 5.

5.3 – Ensaio de atividade da piruvato ferredoxina oxirredutase (PFOR)

O mecanismo de ação mais explorado para o NTZ envolve a inibição da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). Entretanto ao realizar ensaios enzimáticos com extrato celular total do *L. fortunei* não foi observada atividade dessa enzima. Esse resultado era esperado uma vez que a enzima PFOR é considerada exclusiva de organismos anaeróbicos, enquanto organismos aeróbicos possuem a PDH, que não é inibida por NTZ. Assim sendo, esperase que a atividade do NTZ sobre o *L. fortunei* é proveniente de outras interações que não envolvem a PFOR.

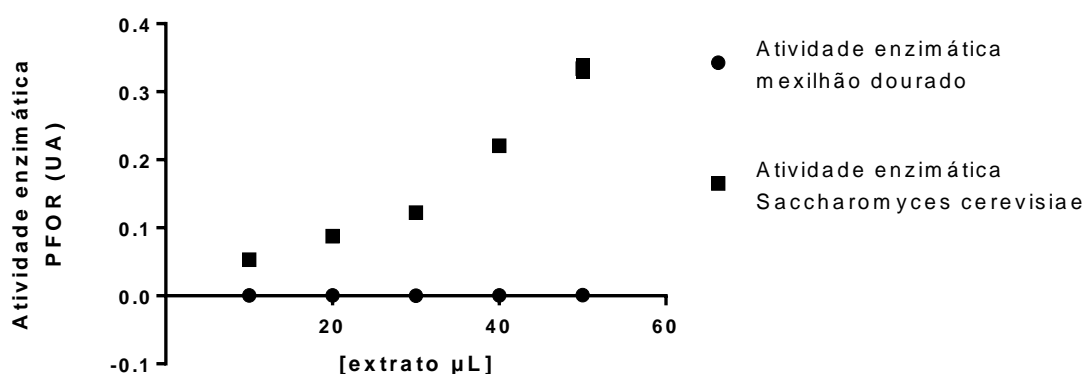


FIGURA 10 – Medidas da atividade enzimática de PFOR para extratos de *L. fortunei* e *Saccharomyces cerevisiae* (controle). Relação entre unidades de absorvância (UA) e volume do extrato utilizado para o ensaio em microlitros.

5.4 – Análise da expressão diferencial de proteínas de mexilhões dourados expostos a NTZ

Uma vez que o NTZ demonstra uma atividade promissora ao combate da infestação por *L. fortunei*, o estudo da expressão diferencial de proteínas decorrente do tratamento com NTZ e a identificação da alteração metabólica e possíveis causas de vulnerabilidade do organismo serão úteis na compreensão do mecanismo de ação e desenvolvimento de novas drogas.

Uma abordagem proteômica foi empregada para investigar o mecanismo de ação do NTZ em *L. fortunei* expostos a doses subletais. A expressão diferencial de proteínas foi avaliada inicialmente por meio da eletroforese bidimensional de forma a identificar macroscopicamente

se os extratos realizados com as doses subletais apresentariam diferenças significativas para determinação da melhor estratégia de identificação. A análise dos géis de eletroforese 2D de extratos proteicos dos mexilhões tratados com NTZ 1 e 5 ppm comparadas ao controle (Figuras 11, 12 e 13) demonstra uma clara alteração do proteoma (destaque em vermelho). Dessa forma, a adoção de uma estratégia de análise por shotgun foi adotada para se maximizar o número de proteínas a serem identificadas e proporcionar uma avaliação quantitativa e qualitativa da diferença de expressão entre tratamento e controle.

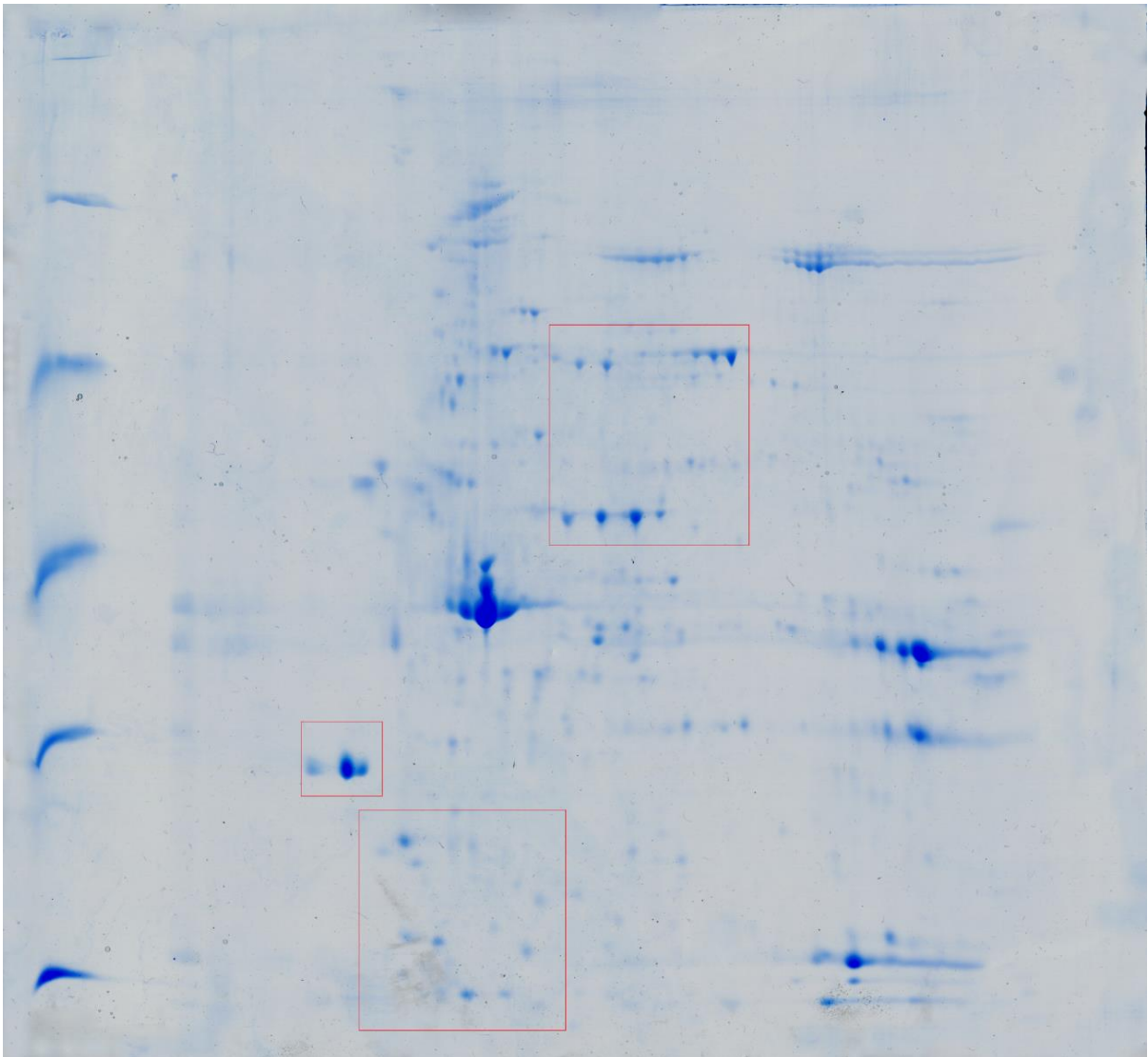


FIGURA 11 – Eletroforese bidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida com isoelctrofocalização de 3-10 pH de 200 microgramas de extrato de *L. fortunei* controle.

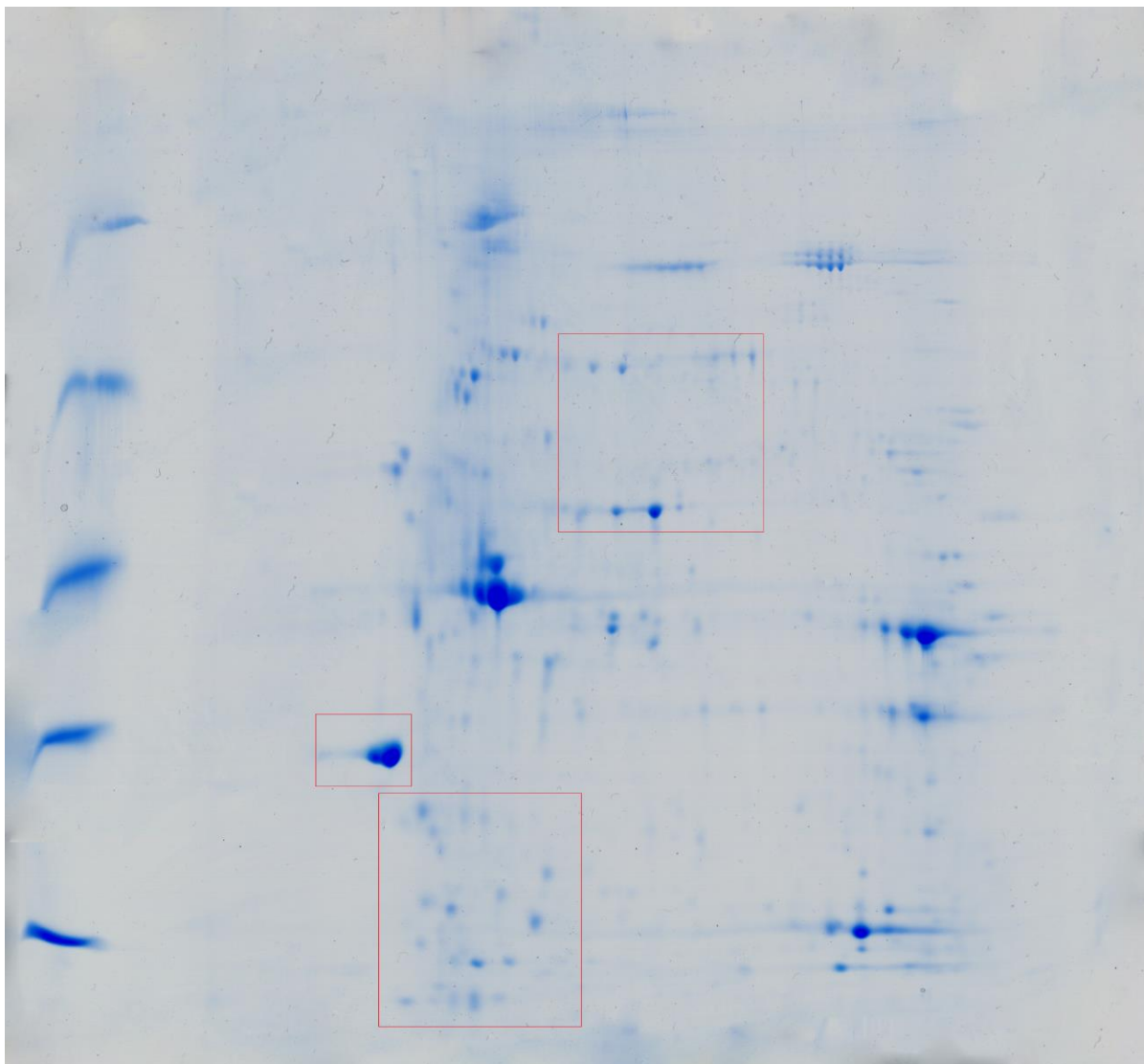


FIGURA 12 – Eletroforese bidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida com isoeletrofocalização de 3-10 pH de 200 microgramas de extrato de *L. fortunei* exposto a 1ppm de NTZ durante 24 horas.

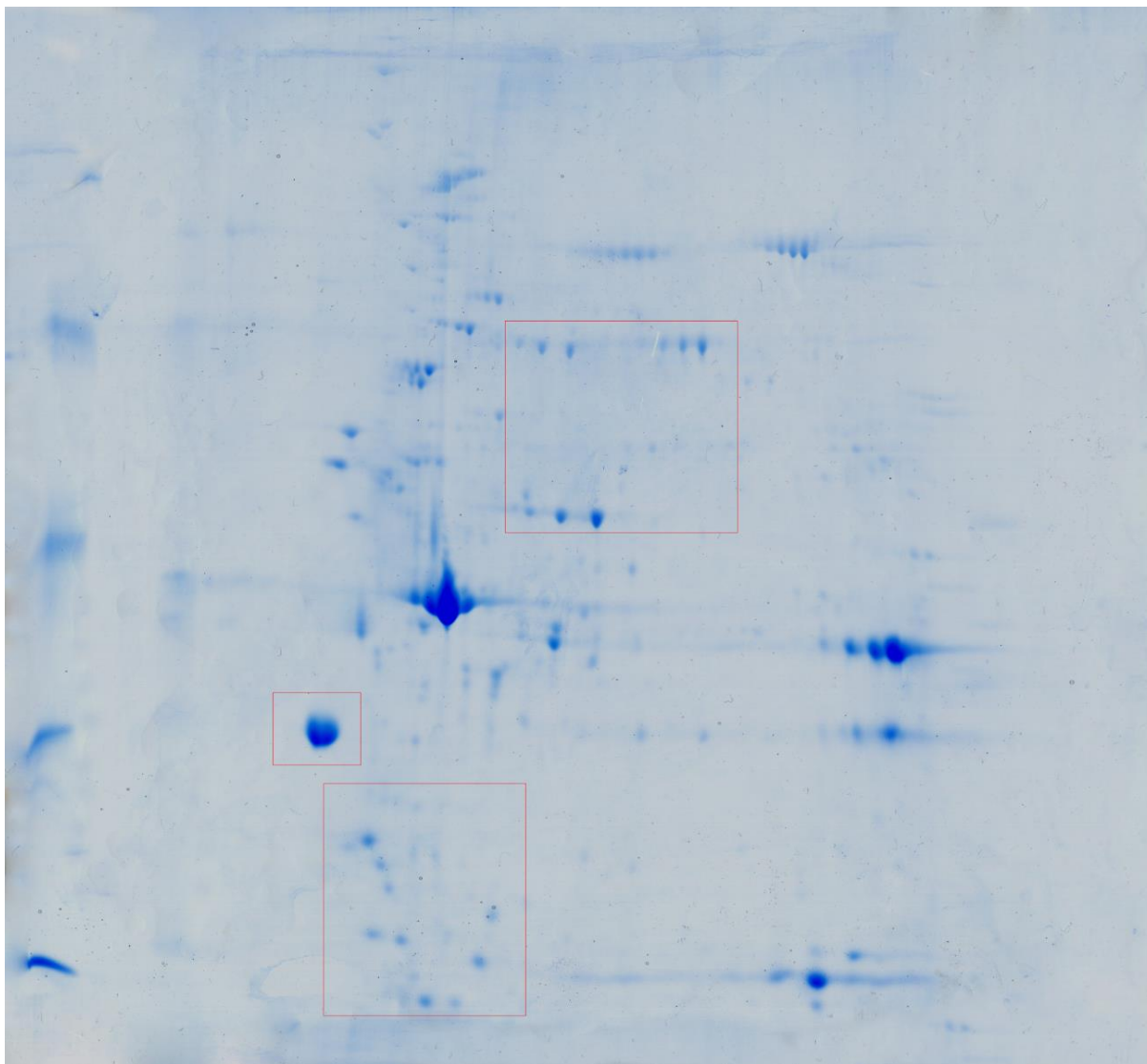


FIGURA 13 – Eletroforese bidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida com isoeletrofocalização de 3-10 pH de 200 microgramas de extrato de *L. fortunei* exposto a 5ppm de NTZ durante 24 horas.

5.5- Imobilização de proteínas em coluna de afinidade de NTZ

Além da alteração do proteoma entre controle e tratamento, o NTZ foi imobilizado em Sepharose 4B ativada por epoxilação N-hidroxisuccinimida para o isolamento de proteínas que interagem especificamente com a droga. Condições estridentes determinadas por um tampão de equilíbrio contendo fosfato 0,03M e NaCl 0,3M em pH 7,0 foram estabelecidas para minimizar interações não específicas. O deslocamento da coluna de afinidade foi realizado de

forma escalonada com aumentos da concentração de NTZ a partir de 10^{-6} M, mas somente foi observado a presença de proteínas no eluato a 10^{-4} M no gel de poliacrilamida. Essa estratégia permitiu a separação de frações de proteínas que apresentaram interação específica com NTZ. A SDS-PAGE da fração retida revela de forma destacada de três bandas de proteínas na posição de aproximadamente 43, 28 e 18 KD (Figura14). Devido a possibilidade de existirem nessa fração proteínas em concentrações abaixo do limite de detecção na revelação da eletroforese, foi adotada a utilização de análise por shotgun que corresponde a análise de proteínas presentes na fração sem separá-las pela eletroforese com o intuito de identificar o máximo de proteínas ligantes ao NTZ que constituem possíveis alvos de ação.

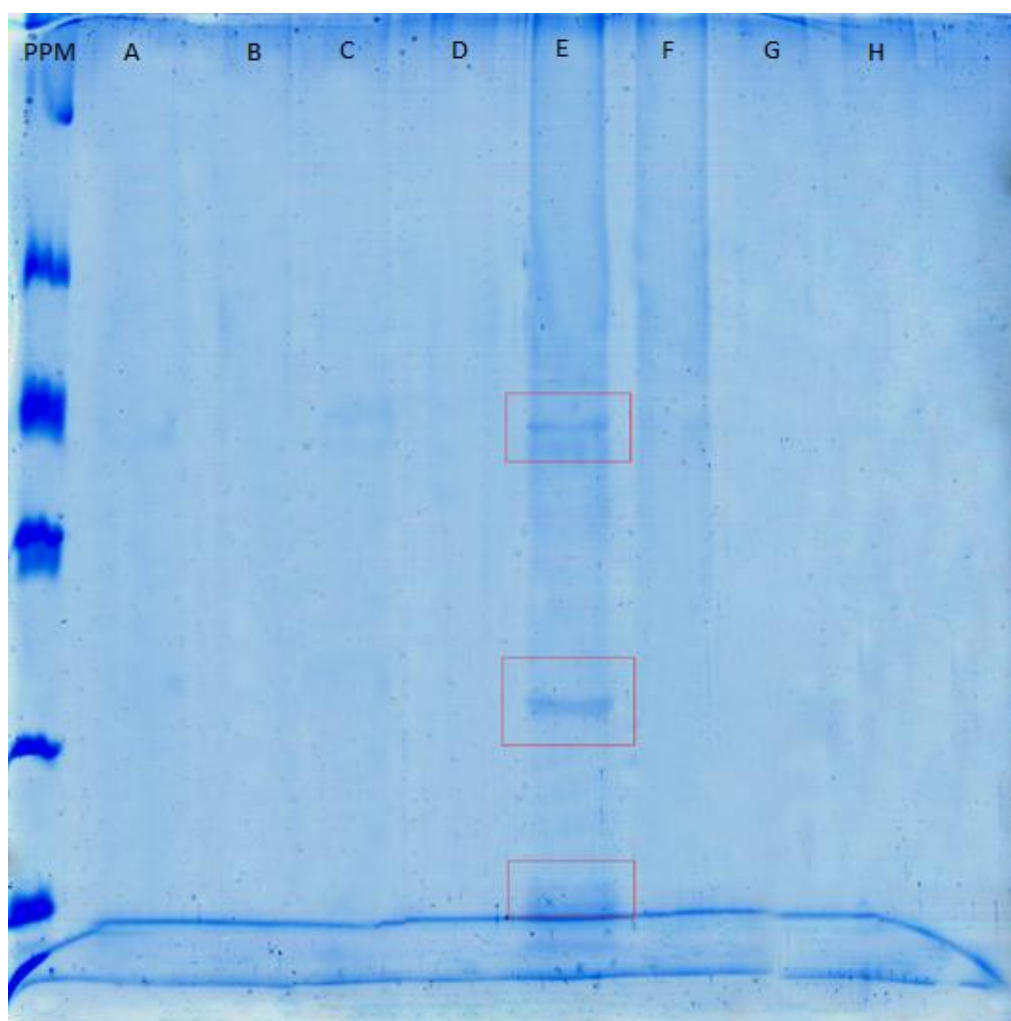


FIGURA 14 – Eletroforese unidimensional SDS PAGE em uma concentração de 12,5% de acrilamida. (PPM) Padrão de Peso Molecular, (A) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-6} M, (B) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-6} M, (C) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-5} M, (D) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-5} M, (E) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-4} M, (F) eluição com 5 mL de NTZ 10^{-4} M, (G) eluição com 5 mL de ácido salicílico 10^{-4} M, (H) eluição com 5 mL de ácido salicílico 10^{-4} M.

5.6 – Caracterização da proteínas da coluna de afinidade de NTZ

A identificação de moléculas proteicas que interagem com a droga pode auxiliar na compreensão do mecanismo de ação que muitas vezes pode estar relacionado com mais de um alvo molecular, tornando a identificação e caracterização de suas interações fundamental para a elucidação de seus possíveis mecanismos de ação. A cromatografia de afinidade quando acoplada a espectrometria de massas e bioinformática, para identificação e caracterização de proteínas, auxilia na diminuição da complexidade da amostra assim como pode apontar possíveis alvos de interação específicos (Azarkan, 2007; Katayama & Oda, 2007; Rix, *et al.*, 2012).

A estratégia adotada, consistiu na imobilização de NTZ em um suporte sólido. Após a interação das proteínas presentes no extrato, a coluna de afinidade foi extensivamente lavada com tampão em elevada concentração salina para diminuição de ligações inespecíficas. Utilizou-se a própria droga para deslocamento progressivo das frações nas concentrações de 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M. Dessa forma, diferentes proteínas foram identificadas e caracterizadas como pode ser apreciado na Tabela 05.

Descrição	Processo biológico	Função	Eluição
Proteína hipotética CGI_10022426 [Crassostrea gigas]	Regulação do processo apoptótico; transdução de sinal	Superfamília de proteínas de interação com domínios de morte; domínio de recrutamento e ativação da caspase	10^{-4} M
Proteína hipotética CGI_10004855 [Crassostrea gigas]	Regulação do processo apoptótico	Domínio N-terminal do Fator de interação nuclear 2 de TERF1	10^{-6} M 10^{-5} M
PREDITA: subunidade beta tipo 3-like do proteasome [Aplysia californica]	Subunidade beta tipo 3 do proteassoma 20S	Sítio de interação da subunidade beta	10^{-4} M
Corrente X, estrutura em cristal de K63-Specifica Fab Apu.3a8 ligado a K63-ligado a Di-Ubiquitina	Proteína de ligação para atividade específica do proteassoma	Ligante proteico para degradação proteassomal	10^{-6} M 10^{-5} M

Proteína calponina-like [<i>Mytilus galloprovincialis</i>]	Proteína calponina-like envolvida na regulação associada ao filamento fino da contração de músculos lisos em moluscos	Inibidor da atividade de Mg^{2+} -ATPase em actomiosina de maneira dose dependente	10^{-6} M 10^{-5} M 10^{-4} M
Arginine quinase [<i>Aplysia kurodai</i>]	Transfosforolização entre N-fosfo-L-arginina e ADP	Ligante de ATP; atividade de quinase	10^{-4} M
Nucleosídeo difosfato quinase B [Crassostrea gigas]	CTP processo biossintético, GTP processo biossintético, UTP processo biossintético	Atividade catalítica ATP + nucleosídeo difosfatase = ADP + nucleosídeo trifosfato; Ligante de ATP	10^{-6} M
Dual oxidase [Crassostrea gigas]	Resposta ao estresse oxidativo	Ligante do íon de cálcio; ligante do grupo heme; atividade de peroxidase; Oxidoreductase	10^{-4} M
Pequena proteína de choque térmico 22 [Mytilus galloprovincialis]	Resposta ao estresse	Atividade chaperona-like	10^{-6} M
PREDITA: Proteína de choque térmico de 70 kDa [Diaphorina citri]	Resposta ao estresse	Formação de proteína; translocação de proteína; regulação de proteína	10^{-5} M
Actina citoplasmática [Pinctada fucata]	Pertence a família das actinas	Componente Celular	10^{-6} M 10^{-4} M
Beta-actina, parcial [Microplitis mediator]	Domínio de ligação nucleotídica da açúcar quinase/HSP70/superfamília das actinas	Ligante de ATP; Componente Celular	10^{-6} M 10^{-5} M 10^{-4} M
Tropomiosina [Argopecten irradians]	Pertence a família das tropomiosinas	Componente Celular	10^{-6} M 10^{-5} M 10^{-4} M
Beta-actina, parcial [Anas platyrhynchos]	Domínio de ligação nucleotídica da açúcar quinase/HSP70/superfamília das actinas	Ligante de ATP; Componente Celular	10^{-6} M 10^{-4} M
Actin tipo 1, parcial [Ostrea edulis]	Pertence a família das actinas	Componente Celular	10^{-5} M
Histona H1-delta [Crassostrea gigas]	Local de ligação do DNA; montagem do nucleossoma	Ligante ao DNA	10^{-4} M
Proteína ribossomal	Enlongamento translacional	Constituinte estrutural do ribossoma	10^{-5} M

[<i>Mytilus galloprovincialis</i>]			
Cadeia leve essencial de miosina [<i>Crassostrea gigas</i>]	Pertence a família das miosinas	Ligante do íon de cálcio	10 ⁻⁶ M 10 ⁻⁵ M 10 ⁻⁴ M
Tropomiosina [<i>Mytilus galloprovincialis</i>]	Pertence a família das tropomiosinas	Componente Celular	10 ⁻⁵ M 10 ⁻⁴ M
Histona H4 [<i>Heterocephalus glaber</i>]	Transcrição do DNA; reparo do DNA; replicação do DNA; estabilidade cromossômica	Ligante ao DNA	10 ⁻⁶ M
Proteína CBG24447 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]	Pertence a família das actinas	Componente Celular	10 ⁻⁶ M

Tabela 05 – Proteínas identificadas por espectrometria de massas e caracterizadas por bioinformática utilizando as ferramentas InterPro, protonet, UniProt, SAAS annotation e BLAST após cromatografia de afinidade com NTZ.

Em relação a proteínas envolvidas na regulação do processo apoptótico, foram identificadas a proteínas hipotética CGI_10004855 [*Crassostrea gigas*] e a proteína hipotética CGI_10022426 [*Crassostrea gigas*]. Apesar de ambas participarem da regulação do processo apoptótico elas não possuem a mesma função. CGI_10004855 [*Crassostrea gigas*] foi associada a TERF1 (telomeric repeating binding fator 1). Essa proteína faz parte do complexo denominado ‘shelterin’, composto pela TERF1 (telomeric repeat binding factor 1), TERF2 (telomeric repeat binding factor 2), TERF2IP (TERF2-interacting protein), POT1 (protection of telomeres 1) e TIN2-organizing protein TPP1 (também conhecida por ACD). Enquanto TERF1, TERF2 e POT1 são responsáveis pelo reconhecimento da sequência de repetição telomérica TTAGGG, TIN2, TPP1 e RAP1 realizam a função de conectores entre as outras proteínas do complexo (Mamdani, 2015).

Esse complexo ‘shelterin’, em conjunto com outras proteínas associadas, preservam os telômeros da fusão entre extremidades (end-to-end fusion), da degradação e de recombinações atípicas, realizando assim a manutenção da estabilidade genômica (Moon & Jarstfer, 2007, Mirabello, 2012). A grande maioria desses componentes são altamente conservados entre as espécies tanto em relação a sequência como função, sendo proposto que níveis elevados de variação genética podem não ser comportados por essas proteínas devido a seu papel fundamental na manutenção dos telômeros (Nakamura and Cech, 1998; Li et al., 2000; Kanoh and Ishikawa, 2003; de Lange, 2004; de Lange, 2005; Savage, et al., 2005, Mirabello, 2012).

As repetições teloméricas diminuem a cada divisão celular devido a inabilidade da maquinaria de replicação do DNA em completar a duplicação total do cromossomo (“the end replication problem”). No momento onde essa sequência se torna criticamente curta, a senescência celular ou apoptose é induzida em células normais devido a inabilidade das proteínas do complexo “sheterin”, como TERF1, de se ligar aos telômeros resultando em uma resposta de dano ao DNA (Gilley et al., 2005; Rodier et al., 2005, Mirabello, 2012, Kulak, 2015).

O comprimento dos telômeros está diretamente relacionado a atividade da enzima telomerase, responsável pela adição da sequência de repetição TTAGGG na porção final 3' dos cromossomos (Mamdani, 2015). Diferentes autores citam TRF1 como um regulador negativo do aumento dos telômeros mediado pela telomerase, uma vez que a expressão de um alelo negativo dominante resulta no alongamento dos telômeros e uma superexpressão de TERF1 causa um encurtamento dos telômeros. Entretanto, essa atividade não pode ser atribuída unicamente a atividade de TERF1, sendo então descrita como uma atividade em *cis* que afeta a habilidade da telomerase em alongar os telômeros (Bianchi, et al.; 1999; Cook, et al., 2002; Kaminker, et al., 2001; Karlseder, et al., 2002; Karlseder et al, 2003).

Apesar do alelo negativo dominante hTRF1 não afetar o crescimento e a viabilidade de diversas células, diferentes observações sugerem funções diferentes da regulação do tamanho dos telômeros para o hTRF1 como a proteção dos telômeros através da ligação com o heterodímero Ku 70/80, sendo que a perda desse heterodímero concomitante a perda da proteína quinase DNA (DNA-PK) é fator conhecido que culmina na remoção dos grupos protetores dos telômeros (Karlseder, et al., 2002; Smogorzewska, 2002; Bailey, et al., 1999; d’Adda di Fagnana, et al., 2001; Hsu, et al., 2000; Seiser, et al., 1993; Karlseder et al, 2003).

Ainda, outros relatos indicam funções como regulação do fuso mitótico, promoção da polimerização de microtubulos *in vitro*, determinação de danos estruturais no DNA e indução direta da apoptose em casos de hiperexpressão de hTRF1, indicando que a função de TRF1 não está limitada somente a regulação do comprimento dos telômeros (Kishi, et al., 2001; Nakamura, et al., 2002; Seiser, et al., 1993; Karlseder et al, 2003).

Por sua vez, CGI_10022426 [*Crassostrea gigas*], está presente na região DD (Death Domain Superfamily of protein-protein interaction domains), mais especificamente na região CARD (Caspase activation and recruitment domain: a protein-protein interaction domain). A apoptose é um processo biológico presente em vertebrados e invertebrados e, apesar de sua complexidade e função sofrer variação de acordo com a espécie, possui funções essenciais para

o desenvolvimento dos organismos assim como para manutenção da homeostase do sistema imune, além de seu papel nos mecanismos de defesa contra infecções virais e bacterianas (Tittel & Steller, 2000; Opferman & Korsmeyer, 2003; DeLeo, 2004).

Durante o fenômeno de apoptose, as caspases possuem os papéis de transmitir o sinal para a morte celular e de clivar diversas proteínas, o que resulta em grande parte das alterações bioquímicas e morfológicas associadas a apoptose. As caspases apoptóticas podem ser divididas entre iniciadoras, responsáveis por mediar a transdução do sinal e ativar o segundo tipo de caspase, as efetoras, através de oligomerização. Após ativadas, as efetoras completam a cascata degradando diversas outras proteínas (Hale et al., 1996; Boatright & Salvesen, 2003; Riedl & Shi, 2004).

Em moluscos a apoptose está presente durante o desenvolvimento larval e, aparentemente, contribui de maneira essencial para resposta imune perante a diferentes estímulos. Devido a seu comportamento sedentário e o fato de serem filtradores, os bivalves são diretamente influenciados pelo ambiente a sua volta, sendo comumente utilizados como bioindicadores em estudos ecotoxicológicos. Essa natureza leva ao acúmulo de substâncias tóxicas em seus organismos como metais pesados, pesticidas e polihidroalcaloides. Devido a sua suscetibilidade a alterações climáticas, patógenos e poluentes, é sugerido que a apoptose é um fator determinante para a sobrevivência desses animais ao ser um dos principais mecanismos que garantem sua homeostase (Terahara & Takahashi, 2008; Sokolova, 2009; Huang, et al., 2010; Romero et al., 2011).

Quanto as proteínas da família das quinases, foram identificadas a arginine kinase [*Aplysia kurodai*] e nucleoside diphosphate kinase B [*Crassostrea gigas*]. Fosfoquinases de maneira geral são enzimas que catalisam a transferência reversível de fosfato entre ATP e compostos naturais de guanidinas, sendo responsáveis pela manutenção energética em células com alta demanda de ATP (Ellington, 2001). Atualmente, fosfoquinases de diferentes parasitos e hospedeiros intermediários estão sendo apontadas como potenciais novos alvos para o desenvolvimento de compostos quimioterápicos (Jarilla et al., 2014).

Devido a sua grande distribuição, arginina quinase é considerada a fosfoquinase mais próxima das fosfoquinases ancestrais, estando presente em *Annelida*, *Coelenterata*, *Platyhelminthes*, *Nemertea*, *Mollusca*, *Phoronida*, *Arthropoda*, *Echinodermata*, *Hemichordata*, and *Chordata*. Ela utiliza um aminoácido não modificado, arginina, como substrato, enquanto outras fosfoquinases utilizam compostos de guanadina específicos. Além

disso, arginina quinase é um monômero funcional de aproximadamente 40 kDa, enquanto outras fosfoquinases são multimeros funcionais (Suzuki & Yamamoto, 2000; Ellington, 2001).

De acordo com Suzuki *et al.* 2000, a arginina quinase de moluscos origina de um ancestral comum e possui uma taxa moderada evolucionária, mantendo um elevado nível de conservação entre as diferentes espécies de moluscos. Além disso, foi sugerido que a arginina quinase em bivalves sofreram uma evolução molecular única, o que resultou em uma atividade elevada dessa enzima nesses organismos em relação a outros invertebrados analisados. Assim, sua elevada eficiência catalítica em bivalves pode sugerir um papel fundamental na manutenção de sua homeostase energética (Takeuchi *et al.*, 2004).

Responsável pela catálise reversível de transfosforilação entre *N*-phospho-L-arginine e ADP, a fosfoarginina possui um papel fundamental como reserva energética devido a capacidade de transferência do fosfato para ADP quando a demanda de ATP aumenta, sendo proposto que ela é a principal responsável pelo suporte de elevações repentinas de atividade celular até o início de outros eventos metabólicos como gliconeogênese, glicólise e fosforilação oxidativa serem ativados, principalmente em células com elevada flutuação e demanda energético como células musculares e neuronais (Ellington, 2001).

Além disso, a expressão de arginina quinase durante o crescimento de *T. cruzi* sugere uma correlação entre a atividade enzimática, disponibilização de nutrientes e a densidade celular ou taxa de replicação, desta forma, ela poderia atuar como regulador de reservas energéticas em condições de baixa disponibilidade de nutrientes ou estresse ambiental (Alonso *et al.*, 2012). No caso de moluscos, Ellington, 2001, propõem que a arginina quinase eleva a habilidade desses organismos em lidar com o estresse ambiental relacionado a condições de hipóxia e acidose. Estudos proteômicos e transcriptômicos demonstram a alteração da concentração de arginina quinase em resposta a estresse gerado pela elevação da temperatura do meio, entretanto com respostas inconsistentes entre diferentes espécies (Gracey *et al.*, 2008; Martinez-Fernandez *et al.*, 2008).

Outros autores discutem sobre diferentes funções atribuídas a essa enzima, como aclimação da exposição a cádmio em *Eriocheir sinensis* e defesa contra infecções virais em *Penaeus stylirostris*, *Macrobrachium rosenbergii* e *Fenneropenaeus chinensis* entre outros, sugerindo funções essenciais em diversos processos biológicos em invertebrados. Assim, a função enzimática da arginina quinase pode ser descrita como ampla e fundamental para diversas atividades metabólicas, seja como fornecedora imediata de energia em casos de demanda ou como principal fornecedora de ATP para diferentes processos celulares durante o

estado de anaerobiose (Astrofsky et al 2002; Morris et al, 2005; Yao et al, 2005; Silvestre et al, 2006; Wang, et al., 2006).

Por sua vez a nucleoside diphosphate kinase B [*Crassostrea gigas*] é um membro da família das nucleosídeo difosfatase kinases que está amplamente distribuída em diferentes organismos. Ela é crucial para a transferência do grupo fosfato de um nucleosídeo trifosfato (NTP) para um nucleosídeo difosfato (NDP), utilizando um mecanismo reversível que envolve a intermediação de fosfohistidina (Parks et al., 1973; Moreira & Murta, 2016). Essa família de enzimas possui funções essenciais em diferentes organismos, como na patogênese bacteriana (Chakrabarty, 1998), regulação da expressão de diferentes genes em mamíferos (Postel, 2003) e na participação de vias de salvamento de purinas em parasitos protozoários (Landfear et al., 2004), além de ser um importante precursor durante a síntese de RNA e de DNA em espécies distintas (Lascu & Gonin, 2000).

Além disso, Moreira & Murta 2016, demonstram uma conservação de cerca de 60% entre a nucleoside diphosphate kinase B de leishimania em relação a mamíferos, o que ele aponta como um indicador de um bom nível de conservação dessa proteína em diferentes organismos. Em mamíferos, está associada também a regulação de angiogênese dependente de VEGFR2, através da ativação de proteína G pela formação de um dímero (Hippe, 2009; Feng, et al., 2014). Outros estudos ainda demonstram a ativação de canais de potássio via fosforilação de histidina, que é necessário para o estímulo do fluxo de cálcio de receptores de células T humanas assim como proliferação e ativação de células T CD4 (Hippe, 2009).

Por sua vez, a small heat shock protein 22 [*Mytilus galloprovincialis*] e a PREDICTED: heat shock 70 kDa protein cognate 4-like [*Diaphorina citri*], fazem parte da família das heat shock proteins (HSPs). Esta classe de proteínas está associada a sobrevivência celular sobre diferentes fatores de estresse que incluem oxidantes, hiperemia, metais pesados, entre outros, sendo sua função e massa molecular fatores que dividem essas proteínas em diferentes famílias que incluem HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as small HSPs (sHSPs) consideradas conservadas entre as espécies (Trent, 1996; Lewis et al., 1999).

Diferentes funções são atribuídas as sHSPs e grande parte delas exibe uma atividade chaperona-like prevenindo a agregação de proteínas alvo, mantendo essas proteínas em um estado de enovelamento e reenovelando elas com ou sem mediação de outras chaperonas ATP dependentes. Dentre os diversos papéis atribuídos a essa família de sHSPs podemos citar a diferenciação celular, autofagia, degradação proteossomal além de uma robusta propriedade antiapoptótica, que envolve vários estágios mediados pela atividade mitocondrial, apoptose

extrínseca assim como outras vias de sobrevivência celular. No caso específico das sHSPs 22, suas principais características associadas são uma atividade chaperona like assim como na regulação da autofagia celular (Bakthisaran, et al., 2015).

Quanto as Hsps 70, foi atribuído a assistência a um amplo espectro de processos de enovelamento, incluindo o enovelamento de novas proteínas sintetizadas, reenovelamento de proteínas mal enoveladas ou agregadas, translocação membranar de proteínas secretadas e de organelas e o controle da atividade de proteínas regulatórias (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Young et al, 2003; Pratt & Toft, 2003). Todas essas propriedades são associadas a interação da HSP 70 com segmentos peptídicos hidrofóbicos de proteínas de forma dependente de ATP. Além de suas funções específicas, as HSPs 70 cooperam com outras HSPs, co-chaperonas e outras proteínas chaperona-like ampliando ainda mais seu papel ao constituir grandes complexos de enovelamento proteico (Mayer & Bukau, 2005)

A dual oxidase [*Crassostrea gigas*] possui função dupla e oposta. De acordo com Fleury e colaboradores 2009, essa proteína é uma enzima transmembrana que possui a mesma função da NADPH oxidase, atuando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante infecções microbianas em ostras, sendo sua expressão em hemócitos associada a resposta desses organismos a infecção de vibrios virulentos (De Lorgeril et al, 2011; Bachère et al, 2015). Por sua vez, Timmins-Schiffman e colaboradores 2014 assim como Wang e colaboradores 2013, apontam uma atividade de resposta ao estresse oxidativo atuando na redução de ROS livre através de um processo de oxirredução peroxidase-like.

Devido a sua presença em organismos desde archiobactérias a mamíferos, o proteassoma é considerado um importante mecanismo celular, sendo o principal responsável pela degradação de diversas proteínas tanto no citosol quanto no núcleo por via não lisossomal, assim como possui envolvimento com diversas respostas celulares principalmente através de seu mecanismo de ubiquitinação. A proteasome subunit beta type-3-like [*Aplysia californica*], é considerada a principal subunidade proteolítica do proteassoma possuindo uma atividade treonina-like. Em relação a Chain X, Crystal Structure Of K63-Specific Fab Apu.3a8 Bound To K63-Linked Di- Ubiquitin, sua identificação representa a presença de ubiquitina na amostra (Seemüller, et al., 1995; Löwe, et al., 1995; Myung, et al., 2001; Jung, et al., 2009; Kisselev, et al., 2012).

A calponina é uma proteína envolvida na contração muscular lisa interagindo com proteínas envolvidas na contração muscular de maneira ATP-dependente. Em relação a calponin-like protein [*Mytilus galloprovincialis*], de acordo com Sirenko 2016, esta possui uma

atividade envolvida na regulação da contração de músculos lisos ao inibir a atividade de Mg^{2+} -ATPase do complexo actomiosina de maneira dose dependente.

As demais proteínas identificadas são consideradas proteínas estruturais que podem ser divididas em proteínas associadas a contração muscular como beta-actin partial [Microplitis mediator], tropomyosin [Argopecten irradians], beta-actin partial [Anas platyrhynchos], actin type 1 partial [Ostrea edulis], myosin essential light chain [Crassostrea gigas], RecName: Full=Tropomyosin [Mytilus galloprovincialis] e Protein CBG24447 [Caenorhabditis briggsae] (tropomiosina), do citoesqueleto celular cytoplasmic actin [Pinctada fucata], da organização do DNA Histone H1-delta [Crassostrea gigas] e Histone H4 [Heterocephalus glaber] e da estrutura básica ribossomal a ribossomal protein [Mytilus galloprovincialis].

5.7- Efeito do NTZ sobre a arginina quinase

Devido a sua identificação no experimento com a coluna de afinidade de NTZ e sua ampla distribuição nos seres vivos, foi realizado um ensaio para determinar como a interação dessa quinase com a molécula de NTZ alteraria sua atividade. Assim, foi utilizado um ensaio onde a oxidação de NADH ocorre através de sua interação com lactato desidrogenase e piruvato, que foi gerado através do fosfoenolpiruvato e o ADP formado pela atividade da arginina quinase. A reação foi monitorada a 340 nm em relação ao tempo.

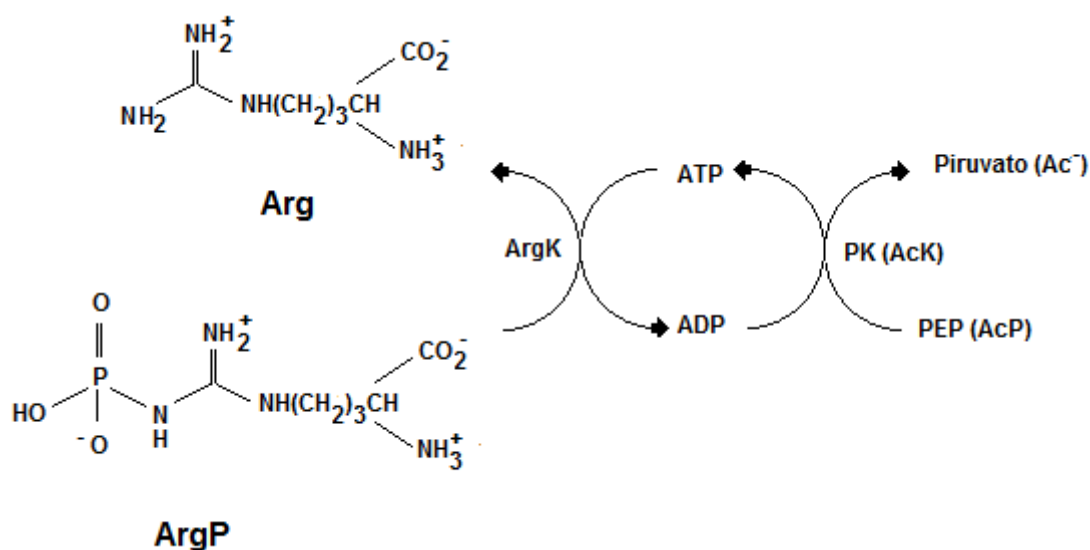


FIGURA 15 – Representação do ciclo de atividade da arginina quinase.

O grupo de guanidinas quinases ou família de fosfato quinases (PK) é um grupo de enzimas que possuem papel fundamental na regulação dos níveis de ATP celular. Essas enzimas catalisam a transferência reversível do grupo γ -fosfato do ATP para um substrato de guanidina (creatinina, arginina ou lombricina). Apesar de sua variação estrutural dos receptores, fosfato quinases possuem um nível de conservação de cerca de 40% da identidade da sequência de aminoácidos entre eles em diferentes espécies (Ellington, 2001; Gattis et al., 2004).

Arginina quinase (AK) e a creatina quinase (CK) são as enzimas da família de fosfato quinases mais representativas. Enquanto creatinina quinase está presente em vertebrados sua análoga arginina quinase é encontrada em invertebrados (Gattis, et al., 2004). No caso das arginina quinases, seu nível de identidade entre as diferentes espécies estudadas até o momento atinge 70% de identidade entre a sequência de aminoácidos (Alonso, et al., 2012; Pruett, et al., 2003). Estudos estruturais demonstram que as arginina quinases possuem uma estrutura monomérica com dois domínios, sendo um C-terminal em folha- β e um N-terminal em α -hélice, com substratos se ligando em ambos domínios (Yousef, et al., 2003).

A inibição da arginina quinase prejudica o equilíbrio energética celular. Uma vez que a célula encontre uma situação de alta demanda de ATP, a ausência ou diminuição de atividade dessa enzima acarreta na depleção das reservas celulares de ATP levando a diminuição do metabolismo/atividade celular o que, acoplado a alta demanda energética, leva a célula a senescência ou diretamente à apoptose (Davulcu, et al., 2009; Alonso, et al., 2012).

Após o ensaio, foi realizada a regração linear no intervalo de tempo de velocidade constante de cada um dos experimentos para a determinação da velocidade da reação, expressa na figura 16. Neste, fica clara a tendência inibitória do NTZ em relação ao controle da reação uma vez que, nas concentrações utilizadas, atingiu-se uma inibição de aproximadamente 40% com a concentração de 10^{-4} M de NTZ. Esses dados nos trazem um resultado inédito em relação a um novo mecanismo de inibição enzimática por parte dessa droga.

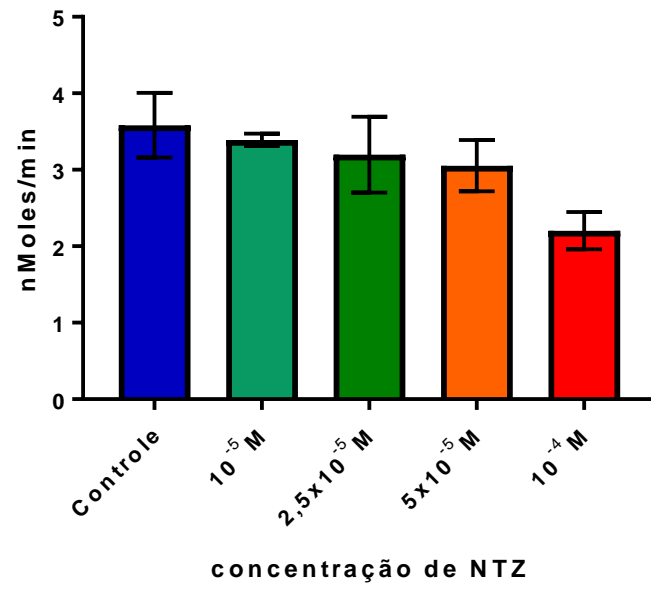


FIGURA 16 - Velocidade de degradação de NADH em nano moles/min pela atividade da arginina quinase em relação a diferentes concentrações de inibidor (NTZ) utilizado.

6. Conclusões

6- CONCLUSÕES

A utilização de NTZ como moluscicida demonstrou atividade significativa em relação aos grupos controle, atingindo mortalidade superiores a 80%. Além disso, sua associação com amônia a $5,87 \times 10^{-6}M$ foi capaz de reduzir a concentração de NTZ necessária para obtenção de resultados similares em concentrações dez vezes menores.

A capacidade do carvão ativado de remover a droga da água demonstra que sua utilização pode ser acoplada a sistemas com capacidade industrial e de rápido fluxo afim de garantir que não exista qualquer variável ecológica que por ventura possa ocorrer com a utilização de NTZ.

O ensaio enzimático para PFOR demonstra que os mexilhões não possuem essa enzima, sugerindo um mecanismo de ação diferente do apontado pela literatura no caso desses animais.

O método de afinidade utilizando a droga obteve dez identificações de proteínas não extraturais envolvidas e atividades que podem ser agrupadas em proteínas envolvidas na regulação da apoptose, proteínas proteassomais, proteínas envolvidas na contração da musculatura lisa de moluscos, proteínas da família das quinases e proteínas de resposta ao estresse celular.

A confirmação da inibição de arginina quinase por NTZ, em combinação com os dados da coluna de afinidade, sugerem um novo mecanismo alvo dessa droga relacionado a diminuição da disponibilidade de ATP em momentos de alta demanda energética celular que ainda não foi explorado. Uma vez que a droga é capaz de inibir a arginina quinase em concentrações de $10^{-4}M$ e que a mesma pode ser acumulada no mexilhão ao longo do tempo de tratamento, a toxicidade apresentada pelo NTZ para o *L. fortunei* pode, em parte, ser explicada através desse mecanismo

Proteínas envolvidas na apoptose interagem com o NTZ e podem representar alvos moleculares relacionados ao mecanismo moluscicida, indicando outro possível mecanismo para sua atividade tóxica.

7. Referências Bibliográficas

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adagu, I. S.; Nolder, D.; Warhurst, D.; Rossignol, J.F. (2002) **In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis***. J. Antimicrob. Chemother 49: 103–111.

Alonso, A.; Lopez-Zavala, R.R.; Sotelo-Mundo, K.D.; Garcia-Orozco, F.; Isac-Martinez, L.G.; (2012) **Crystallization and X-ray diffraction studies of arginine kinase from the white Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei***. Acta Cryst. F68, p. 783–785.

Anderson, L.G.; Dunn, A.M.; Rosewarne, P.J.; Stebbing, P.D. (2015) **Invaders in hot water: a simple decontamination method to prevent the accidental spread of aquatic invasive non-native species**. Biol Invasions. 17(8):2287-2297.

Antizar-Ladislao, B. (2008) **Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review**. Environ. Int., Feb;34(2):292-308.

Astrofsky, K.M.; Roux, M.M.; Klimpel, K.R.; Fox, J.G.; Dhar, A.K. (2002) **Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*)**. Arch Virol. 47:1799e812.

Azarkan, M.; Huet, J.; Baeyens-Volant, D.; Looze, Y.; Vandenbussche, G. (2007) **Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies**. Journal of Chromatography B Volume 849, Issues 1–2, 15 April 2007, 81-90.

Bacela-Spychalska, K.; Grabowski, M.; Rewicz, T.; et al. (2013) **The “killer shrimp” *Dikerogammarus villosus* (Crustacea, Amphipoda) invading Alpine lakes: Overland transport by recreational boats and scuba-diving gear as potential entry vectors?** Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst 23:606–618.

Bachère, E.; Rosa, R.D.; Schmitt, P.; Poirier, A.; Merou, Nicolas.; Charrière, G.M.; Destoumieux, G.D. (2015) **The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view.** *Fish & Shellfish Immunology*. Vol 46, Issue 1, Pages 50-64.

Bailey, S.M.; Meyne, J.; Chen, D.J.; Kurimasa, A.; Li, G.C.; Lehnert, B.E.; Goodwin, E.H. (1999) **DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14899–14904.

Bakthisaran, R.; Tangirala, R.; Rao, C.M. (2015) **Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1854 291–319.

Barnes, D.K.; Alix, M.S.; Camp, J.W. (1998) **The Effects of Magnetic Water Treatment on Zebra Mussels in Laboratory and Industrial Settings.** *Eighth International Zebra Mussel and Other Nuisance Species Conference*, Sacramento, California March 16-19.

Bates, D.; Bates, J. (2003) **Outline of Potential Applications for High Powered Ultrasound In Recycling. Recycled Organics.** *Expanding the Horizons Industry Reference Manual*.

Bergmann, C.P.; Mansur, M.C.D.; Pereira, D.; et al. (2010) **Avaliação de materiais e revestimentos para o controle da incrustação do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Drunker, 1857).** *Biotemas*, 23, 87-100.

Bianchi, A.; Stansel, R.M.; Fairall, L.; Griffith, J.D.; Rhodes, D.; de Lange, T. (1999) **TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility.** *EMBO J.* 18:5735–5744.

Boatright, K.M.; Salvesen, G.S. (2003) **Mechanisms of caspase activation.** *Curr Opin Cell Biol.* 15:725–731.

Boltovskoy, D.; Correa, N.; Cataldo, D.; Sylvester, F. (2006) **Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Rio de la Plata watershed and beyond.** *Biological Invasions* 8: 947-963.

Broekhuysen, J.; Stockts, A.; Lins, R.L.; De Graeve, J.; Rossignol, J.F. (2000) **Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man.** *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38:387-394.

Buchan, L.A.J.; Padilla, D.K. (1999) **Estimating the probability of long-distance overland dispersal of invading aquatic species.** *Ecol Appl* 9:254–265.

Cataldo, D.; Boltovskoy, D.; Marini, V.; et al. (2002) **Tercera jornada sobre conservación de la fauna íctica en el río Uruguay.** Paysandu, Uruguay.

Chakrabarty, A.M. (1998) **Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signaling and polysaccharide synthesis.** *Mol Microbiol.* 28:875–82.

Chambers, C. W. (1956) **A procedure for evaluating the efficiency of bactericidal agents.** *J. Milk Food Technol.*,v.19, n.17, p.183-187.

Claudi, R.; Mackie, G. L. (1994) **Practical manual for zebra mussel monitoring and control.** Lewis Publishers, Boca Raton, FL 227 pp.

Claudi, R. (1995) **Zebra Mussel Mitigation Overview.** Proceedings of The Fifth International Zebra Mussel and Other Aquatic Nuisance Organisms Conference, Toronto, Canada, February 1995.

Cook, B. D.; Dynek, J.N.; Chang, W.; Shostak, G.; Smith. S. (2002) **Role for the related poly(ADP-ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres.** *Mol. Cell. Biol.* 22:332–342.

Costello, C.; Drake, J.M.; Lodge, D.M. (2007) **Evaluating an invasive species policy: ballast water exchange in the Great lakes.** *Ecol Applications* 17: 655–662.

d’Adda di Fagagna, F.; Hande, M.P.; Tong, W. M.; Roth, D.; Lansdorp, P.M.; Wang, Z.Q.; Jackson. S.P. (2001) **Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells.** *Curr. Biol.* 11:1192–1196.

Dan, M.; Wang, A.; Wang, C. (2000) **Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme.** Mol. Microbiol. 36:447–456.

Darrigran, G.; Pastorino, G. (1995) **The recent introduction of a freshwater Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America.** The Veliger 38: 171–175.

Darrigran, G. (2002) **Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments.** Biol. Invasions, 4, 145-156.

Davulcu1, O.; Flynn, P.F.; Chapman, M.S.; Skalicky, J.J. (2009) **Intrinsic Domain and Loop Dynamics Commensurate with Catalytic Turnover in an Induced-Fit Enzyme.** Structure. October 14; 17(10): 1356–1367.

De Kock, W.C.; Bowmer, C.T. (1993) **Bioaccumulation, biological effects and foodchain transfer of contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*).** Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Controls. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. P. 503-533.

de Lange, T. (2004). **T-loops and the origin of telomeres.** Nat Ver Mol Cell Biol 5: 323–329.

de Lange T. (2005) **Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres.** Genes Dev. 19:2100-2110.

De Leo, F.R. (2004) **Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens.** Apoptosis. 9:399–413.

De Lorgeril, J.; Zenagui, R.; Rosa, R.D.; Piquemal, D.; Bachère, E. (2011) **Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis.** PLoS One; 6:e23142.

Donskoy, D.M.; Ludyanskiy, M. (1995) **Low Frequency Sound as a Control Measure for Zebra Mussel Fouling.** Proceedings of The Fifth International Zebra Mussel and Others Aquatic Nuisance Organisms Conference, Toronto, Canada, February, pp: 103 – 108.

Donskoy, D.M.; Ludyanskiy, M.; Wright, D.A. (1996) **Effects of sound and ultrasound on Zebra Mussels**. ASA 131st Meeting, Indianapolis, May.

Dudgeon, D.; Arthington, A.H.; Gessner, M.O.; et al. (2006) **Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges**. Biol Rev 81:163.

Dunne, R.L.; Dunn, L.A.; Upcroft, P.; O'Donoghue, P.J.; Upcroft, J.A. (2003) **Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis***. Cell Res. 13:239–249.

Elazar, M.; Liu, M.; McKenna, S.A.; Liu, P.; Gehrig, E.A.; Puglisi, J.D. (2009) **The anti-hepatitis C agent nitazoxanide induces phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α via protein kinase activated by double-stranded RNA activation**. Gastroenterology. 137(5):1827–35.

Ellington, W.R. (2001). **Evolution and physiological roles of phosphagen systems**. Annual Review of Physiology, 63: 289–325.

Fan-Minogue, H.; Bodapati, S.; Solow-Cordero, D.; (2013) **A c-Myc activation sensor-based high throughput drug screening identifies an anti-neoplastic effect of Nitazoxanide**. Mol Cancer Ther. 12(9): 1896–1905.

Feng, Y.; Gross, S.; Wolf, N.M.; Butenschön, V.M.; Qiu, Y.; Devraj, K.; Liebner, S.; Kroll, J.; Skolnik, E.Y.; Hammes, H. P.; Wieland, T. (2014) **Nucleoside Diphosphate Kinase B Regulates Angiogenesis Through Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Type 2 and Endothelial Adherens Junction Proteins**. Arterioscler Thromb Vasc Biol Arterioscler Thromb Vasc Biol October, 2292-2300.

Ferriz, R. A.; Villar, C. A.; Colautti, D.; Bonetto, C. (2000) **Alimentación de *Pterodoras granulosus* (Valenciennes) (Pisces, Doradidae) en la baja cuenca del Plata**. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales 2 (2), 151-156.

Filippo, R. de. (2003) **Mexilhão dourado nos ecossistemas brasileiros**. SEPRONEWS. Série meio ambiente. Ano 1 no 3 Maio.

Fox, L.M.; Saravolatz, L.D. (2005) **Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent**. Rev. Anti-Infect. Agents 40:1173–1180.

Frenia, G.E.; Spierito, T.J.; Ferris, D.R. (1995) **The Practical Application of Pulse Acoustics in a Northeastern United States Paper Manufacturing Plant**. Search the Sea Grant: National Aquatic Nuisance Species Clearinghouse. pp 58-66.

Gallardo, B.; Aldridge, D.C. (2013) **The “dirty dozen”: socio-economic factors amplify the invasion potential of 12 highrisk aquatic invasive species in Great Britain and Ireland**. J Appl Ecol.

Gates, K.K.; Guy, C.S.; Zale, A.V.; Horton, T.B. (2008) **Adherence of *Myxobolus cerebralis* Myxospores to Waders: implications for disease dissemination**. NAMJ Fish Manag 28:1453–1458.

Gattis, J.L.; Ruben, E.; Fenley, M.O.; Ellington, W.R.; Chapman, M.S. (2004) **The active site cysteine of arginine kinase: structural and functional analysis of partially active mutants**. Biochemistry. 43:8680–8689.

Gilley, D.; Tanaka, H.; Herbert, B. (2005). **Telomere dysfunction in aging and cancer**. Int J Biochem Cell Biol 37: 1000–1013.

Ghabooli, S.; Zhang, A.; Sardin, P.; Paolucci, E.; Sylvester, F.; Perepelizin, P.V.; Briski, E.; Cristescu, M.E.; MacIsaac, H.J. (2013) **Genetic Diversity in Introduced Golden Mussel Populations Corresponds to Vector Activity**. PLoS ONE 8(3): e59328.

Giordani, S.; Neves, P. S.; Andreoli, C. V. (2005) ***Limnoperna fortunei* ou mexilhão dourado: impactos causados, métodos de controle passíveis de serem utilizados e a importância do controle de sua disseminação**. Anais... In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Disponível em:

[http://www.sanepar.com.br/sanepar/CalandraKBX/filesmng.nsf/81AC3A621DD26DAD832570B50065D5A9/\\$File/VI-168Mex ilhaoDourado.pdf?OpenElement](http://www.sanepar.com.br/sanepar/CalandraKBX/filesmng.nsf/81AC3A621DD26DAD832570B50065D5A9/$File/VI-168Mex%20ilhaoDourado.pdf?OpenElement). Acesso em: 20 de agosto de 2016.

Gracey, A. Y.; Chaney, M. L.; Boomhower, J. P.; Tyburczy, W. R.; Connor, K.; Somero, G. N. (2008). **Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment**. *Curr. Biol.* 18, 1501-1507.

Hale, J.; Smith, A.; Sutherland, C.; Stoneman, E.A.; Longthorne, L. (1996) **Apoptosis: molecular regulation of cell death**. *Eur J Biochem.* 236:1–26.

Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. (2002) **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein**. *Science* 295: 1852–1858.

Hippe, H.J.; Wolf, N.M.; Abu-Taha, I.; Mehringer, R.; Just, S.; Lutz, S.; Niroomand, F.; Postel, E.H.; Katus, H.A.; Rottbauer, W.; Wieland, T. (2009) **The interaction of nucleoside diphosphate kinase B with Gbetagamma dimers controls heterotrimeric G protein function**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:16269–16274.

Hoffman, P.S.; Sisson, G.; Croxen, M.A.; Welch, K.; Harman, W.D.; Cremades, N.; Morash, M.G. (2007) **Antiparasitic Drug Nitazoxanide Inhibits the Pyruvate Oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, Selected Anaerobic Bacteria and Parasites, and *Campylobacter jejuni***. *Antmicro. Agent. Chemo. Mar.* p. 868–876.

Homan, S. (1991) **Power plant pests: zebra mussels**. Mechanical Engineering American Society of Mechanical Engineers March.

Horner, D. S.; Hirt, R.P.; Embley, T.M. (1999) **A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes**. *Mol. Biol. Evol.* 16:1280–1291.

Hsu, H.L.; Gilley, D.; Galande, S.A.; Hande, M.P.; Allen, B.; Kim, S.H.; Li, G.C.; Campisi, J.; Kohwi-Shigematsu, T.; Chen, D.J. (2000) **Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining.** *Genes Dev.* 14:2807–2812.

Huang, W.B.; Ren, H.L.; Gopalakrishnan, S.; Xu, D.D.; Qiao, K. (2010) **First molecular cloning of a molluscan caspase from variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) and gene expression analysis with bacterial challenge.** *Fish Shellfish Immunol.* 28:587–595.

Johnson, L.E.; Ricciardi, A.; Carlton, J.T. (2001) **Overland dispersal of aquatic invasive species: a risk assessment of transient recreational boating.** *Ecol Appl* 11:1789–1799.

Jarilla, B.R.; Uda, K.; Suzuki, T.; Acosta, L.P.; Urabe, M.; Agatsuma, T. (2014) **Characterization of arginine kinase from the caenogastropod *Semisulcospira libertina*, an intermediate host of *Paragonimus westermani*.** *Molluscan Stud* (2014) 80 (4): 444-451.

Jung, T.; Catalgol, B.; Grune, T. (2009) **The proteasomal system.** *Mol. Aspects. Med.* 30, 191-296.

Kanoh, J.; Ishikawa, F.; (2003). **Composition and conservation of the telomeric complex.** *Cell Mol Life Sci* 60: 2295–2302.

Kaminker, P.G., S. H. Kim, R. D. Taylor, Y. Zebarjadian, W. D. Funk, G. B. Morin, P. Yaswen, and J. Campisi. (2001) **TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression.** *J. Biol. Chem.* 276:35891–35899.

Karatayev, A.Y.; Burlakova, L.E.; Padilla, D.K. (2002) **Impacts of zebra mussel on aquatic communities and their role as ecosystem engineers.** *Inv. Aqua. Speci. Europe*, 433-446.

Karatayev, A.Y.; Boltovskoy, D.; Padilla, D.; Minchin, D.; Boltovskoy, D.; Burlakova, L.E. (2007) **The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts.** *The Journal of Shellfish Research* 26: 205-213.

Karlseder, J.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. (2002) **Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss.** *Science* 295:2446–2449.

Karlseder, J.; Kachatrian, L.; Takai, H.; Mercer, K.; Hingorani, S.; Jacks, T.; de Lange, T. (2003) **Targeted Deletion Reveals an Essential Function for the Telomere Length Regulator Trf1.** *Mol Cell Biol.*, Sept., p. 6533–6541.

Katayama, H.; Oda, Y. (2007) **Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography.** *Journal of Chromatography B* Volume 855, Issue 1, 1 August, 21-27.

Kishi, S.; Zhou, X.Z.; Ziv, Y.; Khoo, C.; Hill, D. E.; Shiloh, Y.; Lu, K.P. (2001) **Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks.** *J. Biol. Chem.* 276:29282–29291.

Kisselev, A.F.; van der Linden, W.A.; Overkleeft, H.S. (2012) **Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target.** *Chemistry & Biology* 19, 99-115.

Kluza, D.A.; McNyset, M. (2005) **Ecological niche modeling of aquatic invasive species.** *Aquatic Invaders* 16(1): 1-7.

Kowalski, E. L.; Kowalski, S. C. (2008) **Revisão sobre métodos de controle do mexilhão dourado em tubulações.** *Revista Produção On-line*, v. 8, n. 2, Julho.

Kulak, O.; Chen, H.; Holohan, B.; Wu, X.; He, H.; Borek, D.; Otwinowski, Z.; Yamaguchi, K.; Garofalo, L.A.; Ma, Z.; Wright, W.; Chen, C.; Shay, J.W.; Zhang, X.; Lum, L. (2015). **Disruption of Wnt/_-catenin signaling and telomeric shortening are inextricable consequences of tankyrase inhibition in human cells.** *Mol Cell Biol* 35:2425–2435.

Landfear, S.M.; Ullman, B.; Carter, N.S.; Sanchez, M.A. (2004) **Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa.** *Eukaryot Cell.* 3:245–54.

Lascu, I.; Gonin, P. (2000) **The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases.** J Bioenerg Biomembr. 32:237–46.

Lewis, S.; Handy, R.; Cordi, B.; Billingham, Z.; Depledge, M.H. (1999) **Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker.** Ecotoxicology, 8 : 351-368.

Li, B.; Oestreich, S.; de Lange, T. (2000). **Identification of human Rap1: implications for telomere evolution.** Cell 101: 471–483.

Löwe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. (1995) **Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution.** Science 268, 533–539.

Ludwig, H.R.; Leitch, J.A. (1996) **Interbasin transfer of aquatic biota via anglers' bait buckets.** Fisheries 21:14–18.

Mackie, G.L. (1995) **Efficacy of Low Level Electric Current (A-C) for Controlling Quagga Mussels in the Welland Canal.** Proceedings of The Fifth International Zebra Mussel and Other Aquatic Nuisance Organisms Conference, Toronto, Canada, February.

Mahon, A.R.; Barnes, M.A.; Senapati, S.; Feder, J.L.; Darling, J.A.; et al. (2011) **Molecular Detection of Invasive Species in Heterogeneous Mixtures Using a Microfluidic Carbon Nanotube Platform.** PLoS ONE 6(2): e17280.

Mamdani; F.; Rollins; B.; Morgan; L.; Myers.; R.M.; Barchas; J.D.; Schatzberg; A.F.; Watson; S.J.; Akil; H.; Potkin; S.G.; Bunney; W.E.; Vawter; M.P.; Sequeira; P.A. (2015) **Variable telomere length across post-mortem human brain regions and specific reduction in the hippocampus of major depressive disorder.** Transl Psychiatry 5, e636.

Mansur, M. C. D.; Richinitti, L. M. Z.; Santos, C. P. (1999) ***Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), molusco bivalve invasor, na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil.** *Biociências* 7: 147-150.

- Martinez-Fernandez, M.; Rodriguez-Pineiro, A. M.; Oliveira, E.; Paez de la Cadena, M.; Rolan-Alvarez, E. (2008). **Proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation.** J. Proteome Res. 7, 4926-4934.
- Mason, T.J.; Duckhouse, H.; Joyce, E.; Lorimer, J.P. (2003) **Uses of Ultrasound in the Biological Decontamination of Water.** World Congress on Ultrasonics, Paris, France.
- Matsui, Y.; Nagaya, K.; Funahashi, G.; et al. (2002) **Effectiveness of antifouling coatings and water flow in controlling attachment of the nuisance mussel *Limnoperna fortunei*.** Biofouling, 18, 137-148.
- Matthews, M.A.; McMahon, R.F. (1994) **The Survival of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian Clams (*Corbicula fluminea*) Under Extreme Hypoxia.** Proceedings of The Fourth International Zebra Mussel Conference, Madison, Wisconsin, March.
- Mayer, M.P.; Bukau, B. (2005) **Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism.** CMLS, Cell. Mol. Life Sci. Vol. 62, p870 884.
- Megraud, F.; Occhialini, A.; Rossignol, J.F. (1998) **Nitazoxanide: a potential drug for eradication of *Helicobacter pylori* with no cross-resistance to metronidazole.** Antimicrob. Agents Chemother. 42:2836–2840.
- Meyer, S. T. (1994) **Chlorine Use in Water Disinfection, Trihalomethane Formation, and Potential Risks to Public Health.** Cad. Saúde Públ. Rio de Janeiro, 10 (1): 99-110, Jan/Mar.
- Miller, R.C.; McClure, F.A. (1931) **The fresh-water clam industry of the Pearl River.** Lingnan Science Journal 10: 307–322.
- Mingyang, L.; Yunwei, J.; Kumar, S.; Stohlgren, T.J. (2008) **Modeling potential habitats for alien species *Dreissena polymorpha* in Continental USA.** Acta Ecologica Sinica 28: 4253–4258.

- Mirabello; L.; Yeager; M.; Chowdhury; S.; Qi; L.; Deng; X.; Wang; Z.; Hutchinson; A.; Savage; S.A. (2012) **Worldwide genetic structure in 37 genes importante in telomere biology**. *Heredity* 108, 124–133.
- Moon, I.; Jarstfer, M. (2007). **The human telomere and its relationship to human disease, therapy, and tissue engineering**. *Front Biosci* 12: 4595–4620.
- Moreira, D.S.; Murta, S.M.F. (2016) **Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in *Leishmania braziliensis* antimony resistance Phenotype**. *Parasites & Vectors*. 9:641.
- Morris, S.; van Aardt, W.J.; Ahern, M.D. (2005) **The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia**. *Aquat Toxicol* 75:16e31.
- Morton, B. (1977) **The population dynamics of *Limnoperna fortune* (Dunker 1857)**. *Malacologia*, 16, 165-82.
- Morton, B. (1982) **The reproductive cycle in *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (*Bivalvia: Mytilidae*) fouling Hong Kong's raw water supply system**. *Oceanol Limnol Sin* 13: 319-325.
- Myung, J.; Kim, K.B.; Crews, C.M. (2001) **The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors**. *Med. Res. Rev.* 21(4), 245-273.
- Nakamura, T.; Cech, T. (1998). **Reversing time: Origin of telomerase**. *Cell* 92: 587–590.
- Nakamura, M.; Zhen Zhou, X.; Kishi, S.; Ping Lu, K. (2002) **Involvement of the telomeric protein Pin2/TRF1 in the regulation of the mitotic spindle**. *FEBS Lett.* 514:193–198.
- Oliveira, M.D.; Calheiros, D.F. (2000) **Flood pulse influence on phytoplankton communities of the south Pantanal floodplain, Brazil**. *Hydrobiologia* 427:101-112.

- Oliveira, M.D., Takeda, A.M., Barros, L.F., et al. (2006) **Invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (*Bivalvia*, *Mytilidae*) of the Pantanal wetland.** Brazil. J. Biol. Invasions, 8, 97-104.
- Oliveira, M.D.; Hamilton, S.K.; Jacobi, C.M. (2010) **Forecasting the expansion of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei* in Brazilian and North American rivers based on its occurrence in the Paraguay River and Pantanal wetland of Brazil.** Aquatic Invasions, v.5, n.1, 59-73.
- O'Neill, J.R.; Charles, R. (1996) **The Zebra Mussel Impacts and Control** – Cornell Cooperative Extension, Information Bulletin 238.
- O'Neill, C.R.J. (1997) **Economic impact of zebra mussels – Results of the 1995 National Zebra Mussel Information Clearinghouse Study.** Great Lakes Res. Review, 3, 35-42.
- Opferman, J.T.; Korsmeyer, S.J. (2003) **Apoptosis in the development and maintenance of the immune system.** Nature Immunol. 4:410–415.
- Orensanz, J.M.; Schwindt, E.; Pastorino, G.; et al. (2002) **No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern atlantic ocean.** Biol. Invasions, 4, 115.
- Ostlie, L.S.; Nelson, J.R.; Whiley, R.J. (1994) **The Efficacy of Pulsed Electric Fields in Preventing Settlement of Zebra Mussel Veligers.** Proceedings of The Fourth International Zebra Mussel Conference, Madison, Wisconsin, March.
- Parks, R.E.; Jr Brown, P.R.; Cheng, Y.C.; Agarwal, K.C.; Kong, C.M.; Agarwal, R.P.; Parks, C.C. (1973) **Purine metabolism in primitive erythrocytes.** Comp Biochem Physiol B. 45:355–64.
- Pastorino, G.; Darrigran, G.; Martin, S.; Lunaschi, L. (1993) ***Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (*Mytilidae*) nuevo bivalvo invasor em aguas del Rio de la Plata.** Neotropica 39:34.

- Penchaszadeh, P.E.; Darrigan, G.; Angulo, C.; Averbuj, A.; Brignoccoli, N.; Brogger, M.; Dogliotti, A.; Pires, N. (2000) **Predation on the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1957) (*Mytilidae*) by the fish *Leporinus obtusidens* (Valencienes, 1846) (*Anostomidae*) in the Rio de la Plata, Argentina** Journal of Shellfish Research, 19:229-231.
- Pimentel, D.; Lach, L.; Zuniga, R.; Morrison, D. (1999) **Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States.** Bioscience 50:53–65.
- Postel, E.H. (2003) **Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation.** J Bioenerg Biomembr. 35:31–40.
- Pratt, W.B.; Toft, D.O. (2003) **Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery.** Exp. Biol. Med. (Maywood) 228: 111–133.
- Preston, B.L.; Snell, T.W.; Kneisel, R. (1999) **UV-B exposure increases acute toxicity of pentachlorophenol and mercury to the rotifer *Brachionus calyciflorus*.** Environmental Pollution, V.106 pp 23-31.
- Pruett, P.S.; Azzi, A.; Clark, S.A.; Yousef, M.; Gattis, J.L.; Somasundaram, T.; Ellington, W.R.; Chapman, M.S. (2003) **The putative catalytic bases have, at most, an accessory role in the mechanism of arginine kinase.** J Biol Chem. 29:26952–26957.
- Rasoloson, D.; Vanacova, S.; Tomkova, E.; Razga, J.; Hrdy, I.; Tachezy, J.; Kulda, J. (2002) **Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*.** Microbiology 148:2467–2477.
- Ricciardi, A. (1998) **Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (*Mytilidae*): another fouling threat to freshwater systems.** Biofouling 13(2): 97-106.
- Riedl, S.J.; Shi, Y. (2004) **Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.** Nat Rev Mol Cell Biol. 5:897–907.

Rix, U.; Gridling, M.; Superti-Furga, G. (2012) **Compound Immobilization and Drug-Affinity Chromatography**. In: Drewes G., Bantscheff M. (eds) *Chemical Proteomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 803. Humana Press, Totowa, NJ.

Rodier, F.; Kim, S.; Nijjar, T.; Yaswen, P.; Campisi, J. (2005). **Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance**. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 977–990.

Romero, A.; Estevez-Calvar, N.; Dios, S.; Figueras, A.; Novoa, B. (2011) **New Insights into the Apoptotic Process in Mollusks: Characterization of Caspase Genes in *Mytilus galloprovincialis***. *PLoS ONE* 6(2): e17003.

Rosignol, J.F.; Maisonneuve, H. (1984) **Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana***. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:511–512.

Ryan, R. F. (1997) **Extremely Low Frequency Electromagnetism: An Effective Nonchemical Method for Control of Zebra Mussel Infestation**. Eighth International Zebra Mussel and Other Nuisance Species Conference, Sacramento California March 16-19.

Samuelson, J. (1999) **Why metronidazole is active against both bacteria and parasites**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3:1533–1541.

Savage, S.; Stewart, B.; Eckert, A.; Kiley, M.; Liao, J.; Chanock, S; (2005). **Genetic variation, nucleotide diversity, and linkage disequilibrium in seven telomere stability genes suggest that these genes may be under constraint**. *Hum Mutat* 26: 343–350.

Schoenbach, K.H.; Alden, R.W.; Fox, T.J. (1996) **Effect of pulsed Electric Fields on Aquatic Nuisance Species, Zebra Mussels and Other Aquatic Nuisance Species**." Ed. By Frank D'itri, Ann Arbor Press.

Seemüller, E.; Lupas, A.; Stock, D.; Lowe, J.; Huber, R.; Baumeister, W. (1995) **Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease**. *Science*.Science 268, 579–582.

Seiser, C.; Teixeira, S.; Kuhn, L.C. (1993) **Interleukin-2-dependent transcriptional and post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA**. J. Biol. Chem. 268:13074–13080.

Sieracki, J.L.; Bossenbroek, J.M.; Chadderton, W.L. (2014) **A Spatial Modeling Approach to Predicting the Secondary Spread of Invasive Species Due to Ballast Water Discharge**. PLoS ONE 9(12): e114217.

Silvestre, F.; Dierick, J.F.; Dumont, C.; Dieu, M.; Raes, M.; Devos, P. (2006) **Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium**. Aquat Toxicol. 76:46e58.

Smogorzewska, A.; Karlseder, J.; Holtgreve-Grez, H.; Jauch, A.; de Lange, T. (2002) **DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2**. Curr. Biol. 12:1635–1644.

Smythe, A.G.; Jonh, F.D.; Reed, T. A.; Sawyko, P. M. (1994) **Application of Cost Effective Electric Fields to Determiation Attachment of the Zebra Mussel to Structures** Proceedings of The Fourth International Zebra Mussel Conference, Madison, Wisconsin, March.

Smythe, G. (1995) **Pulse Power Generated Electric Fields as a Means to Control Zebra Mussels**. Proceedings of The Fifth International Zebra Mussel and Other Aquatic Nuisance Organisms Conference, Toronto, Canada, February.

Smythe, A.G.; Lange, C.L.; Tuttle, L.R. (1996) **Evaluation of an In-Line Pulse- Power Plasma Generator As a Method to Control Zebra Mussels**. Zebra Mussels and Other Aquatic Nuisance Species." Ed. by Frank D'itri, Ann Arbor Press.

Smythe, A.G.; Lange, C.L.; Schoenbanch, K.H.; Abou-Ghazalay, Y. (1998) **Pulse Power Electric Field as a Method to Prevent Settlement of and/or Induce Mortality in Zebra Mussels; Eighth International Zebra Mussel and Other Nuisance Species Conference**, Sacramento California March 16-19.

Sokolova, I.M. (2009) **Apoptosis in molluscan immune defense.** *Inv Survival J.* 6:49–58.

Stasko, A.D.; Patenaude, A.L.; Strecker, A.L.; Arnott, S.E. (2012) **Portage connectivity does not predict establishment success of canoe-mediated dispersal for crustacean zooplankton.** *Aquat Ecol* 49:9–24.

Stebbing, P.; Sebire, M.; Lyons, B. (2011) **Evaluation of a number of treatments to be used as biosecurity measures in controlling the spread of the invasive killer shrimp (*Dikergammarus villosus*).** Report C5256, Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science.

Strayer, D.L. (2010) **Alien species in fresh waters: ecological effects, interactions with other stressors, and prospects for the future.** *Freshw Biol* 55:152–174.

Sutili, F.J.; Gressler, L.T.; Vargas, A.C.; Zeppenfeld, C.C.; Baldisserotto, B.; Cunha, M.A. (2013) **The use of nitazoxanide against the pathogens *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* in silver catfish (*Rhamdia quelen*).** *Vet Parasitol.* Nov 8;197(3-4):522-6.

Suzuki, T.; Fukuta, H.; Nagato, H.; Umekawa, M. (2000). **Arginine kinase from *Nautilus pompilius*, a living fossil: site-directed mutagenesis studies on the role of amino acid residues in the guanidine specificity region.** *Journal of Biological Chemistry*, 275: 23884–23890.

Suzuki, T.; Yamamoto, Y. (2000). **Gene structure of two-domain arginine kinase from *Anthopleura japonica* and *Pseudocardium sachalinensis*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 127: 513–518.

Takeuchi, M.; Mizuta, C.; Uda, K.; Fujimoto, N.; Okamoto, M.; Suzuki, T. (2004). **Unique evolution of bivalvia arginine kinases.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 110–117.

Terahara, K.; Takahashi, K. (2008) **Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs.** *Curr Pharm Design.* 14:131–137.

Timmins-Schiffman, E.; Coffey, W.D.; Hua, W.; Nunn, B.L.; Dickinson, G.H.; Roberts, S.B. (2014) **Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas***. Timmins-Schiffman et al. BMC Genomics, 15:951.

Tittel, J.N.; Steller, H.A. (2000) **Comparison of programmed cell death between species**. Genome Biol. 1:1–6.

Tominaga, M; Mídio, A. (1999) **Exposição humana a trialomitanos presentes em água tratada**. Revista de Saúde Pública São Paulo: v.33 n.4.

Trent, J.D. (1996) **A review of acquired thermotolerance, heatshock proteins, and molecular chaperones in archaea**. FEMS Microbiology Reviews , 18 : 249-258.

Uliano-Silva, M.; Fernandes, F.F.C.F.; de Holanda, I.B.B; Rebelo, M.F. (2013) **Invasive species as a threat to biodiversity: The golden mussel *Limnoperna fortunei* approaching the Amazon River basin**. PLoS One. 9(7): e102973.

Uliano-Silva, M.; Americo, J.A.; Brindeiro, R.; Dondero, F. (2014) **Gene Discovery through Transcriptome Sequencing for the Invasive Mussel *Limnoperna fortunei***. PLoS ONE 9(7): e102973.

Upcroft, J.A.; Campbell, R.W.; Benakli, K.; Upcroft, P.; Vanelle, P. (1999) **Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and –resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba spp.*** Antimicrob. Agents Chemother. 43:73–76.

Upcroft, J.A.; Dunn, L.A.; Wright, J. M.; Benakli, K.; Upcroft, P.; Vanelle, P. (2006) **5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis***. Antimicrob. Agents Chemother. 50:344–347.

Wang, B.; Li, F.; Dong, B.; Zhang, X.; Zhang, C.; Xiang, J. (2006) **Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) Infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA Microarray**. Mar Biotech. 8:491e500.

Wang, S.; Hou, R.; Bao, Z.; Du, H.; et al. (2013) **Transcriptome sequencing of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and comparative transcriptomic analysis with Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)**. PLoS One 8: e63927.

Yao, C.L.; Wu, C.G.; Xiang, J.H.; Dong, B. (2005) **Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis***. Fish Shellfish Immunol. 19:317e29.

Young, J.C.; Barral, J.M.; Ulrich Hartl, F. (2003) **More than folding: localized functions of cytosolic chaperones**. Trends. Biochem. Sci. 28: 541–547.

Yousef, M.S.; Clark, S.A.; Pruetz, P.K.; Somasundaram, T.; Ellington, W.R.; Chapman, M.S. (2003) **Induced fit in guanidino kinases-comparison of substrate-free and transition state analog structures of arginine kinase**. Protein Sci. 12:103–111.

Zanella, O.; Marena, L.D. (2002) **Ocorrência de *Limnoperna fortunei* na Central Hidrelétrica de Itaipu**. V Congresso Latinoamericano de Malacologia. Anais do V Congresso Latinoamericano de Malacologia, São Paulo: Instituto Butantan/ Instituto de Biociências-USP, p. 41.