

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Glaucia Maria Campos

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DE GAMA-
DECANOLACTONA NO MODELO EXPERIMENTAL DE *CAENORHABDITIS*
*ELEGANS***

PORTO ALEGRE

2024

GLAUCIA MARIA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DE GAMA-
DECANOLACTONA NO MODELO EXPERIMENTAL DE *CAENORHABDITIS*
*ELEGANS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) ou doutor(a) em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Pereira

Porto Alegre

2024

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de mestrado não seria possível sem o apoio e a colaboração de várias pessoas, e pela instituição.

Em primeiro lugar, agradeço à minha Orientadora Professora Doutora Patrícia Pereira, pela oportunidade, confiança, orientação, paciência e incentivo ao longo dessa jornada. Sua expertise e dedicação foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos colegas e colaboradores do Laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-Clinica do ICBS-UFRGS, Peterson Alves Santos, Mariana Uczay, Ph D., Thais Lemos Mendes, Larissa Lobo, Pricila Pflüger, Ph D., muito obrigada pela parceria, aprendizado, colaboração, sem vocês seria muito mais difícil, talvez até impossível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica da UFRGS, em especial a Profa. Dra. Rosane sempre muito solícita e atenciosa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar a estrutura e os recursos necessários para a realização desta pesquisa.

Aos meus familiares, em especial ao meu Pai, Luiz Carlos Campos, pelo amor, compreensão e suporte incondicional em todos os momentos. Sem o apoio de vocês, este sonho não seria possível.

A todos os meus amigos, que de alguma forma contribuíram para esta conquista, seja com palavras de incentivo, conselhos ou simplesmente com a presença.

Muito Obrigada a todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da Gama-decanolactona 10

Figura 2: Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* 14

RESUMO

As doenças neurológicas representam um desafio significativo para a saúde pública, afetando milhões de pessoas globalmente. Assim, a busca por novas moléculas terapeuticamente úteis é de grande importância. Gama-decanolactona (GD) é uma lactona monoterpênica que demonstrou várias atividades em modelos animais, como efeito hipnótico, hipotérmico e anticonvulsivante. Mostrou-se neuroprotetora em diferentes modelos de crises epiléticas em camundongos, como crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), pilocarpina, isoniazida e 4-aminopiridina. Demonstrou modular parâmetros inflamatórios e oxidativos, além de proteger danos induzidos ao DNA. Porém, o perfil de toxicidade de GD foi pouco explorado. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade e o perfil antioxidante da GD utilizando *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo experimental, bem como em modelos *in silico*. *C. elegans* foi usado para determinar a concentração letal mediana (CL₅₀) de GD, bem como o seu efeito na sobrevivência, desenvolvimento, ensaios de reprodução, bombeamento faríngeo e resistência ao estresse oxidativo. A CL₅₀ calculada para GD foi de 212,16 ± 5,56 µM/ml. GD reduziu a sobrevivência dos vermes, tanto nos estágios L1 quanto L4, de maneira dependente da concentração. O desenvolvimento, a reprodução e bombeamento faríngeo de *C. elegans*, nas três concentrações testadas (25, 50, 100 µM/ml), não foram alterados por GD. No ensaio de estresse térmico, GD não alterou a sobrevivência padrão dos vermes. No ensaio de estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) reduziu a sobrevivência de *C. elegans*, bem como o número de bombeamento faríngeo, sendo esses efeitos revertidos por GD no tempo de 1h de exposição dos vermes L1 ao H₂O₂ (50 µM/ml) e 2 e 3h após exposição ao H₂O₂ em L4 (25 e 50 µM/ml). O estudo *in silico* não indicou potencial hepatotóxico, cardiotoxico ou mutagênico para GD.

Em conclusão, GD apresentou baixotoxicidade e um bom perfil antioxidante tanto nos ensaios *in silico* e *in vivo* em *C. elegans*.

ABSTRACT

Neurological diseases represent a significant public health challenge, affecting millions of people globally. Therefore, the search for new therapeutically useful molecules is of great importance. Gamma-decanolactone (GD) is a monoterpene lactone that has demonstrated several activities in animal models, such as hypnotic, hypothermic and anticonvulsant effects. It was shown to be neuroprotective in different models of epileptic seizures in mice, such as seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ), pilocarpine, isoniazid and 4-aminopyridine. It has been shown to modulate inflammatory and oxidative parameters, in addition to protecting induced DNA damage. However, the toxicity profile of GD has been little explored. Therefore, this study aimed to evaluate the toxicity and antioxidant profile of GD using *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as an experimental model, as well as in silico models. *C. elegans* was used to determine the median lethal concentration (LC₅₀) of GD, as well as its effect on survival, development, reproduction assays, pharyngeal pumping, and resistance to oxidative stress. The calculated LC₅₀ for GD was

212.16 ± 5.56 µM/ml. GD reduced worm survival at both L1 and L4 stages in a concentration-dependent manner. The development, reproduction and pharyngeal pumping of *C. elegans*, at the three concentrations tested (25, 50, 100 µM/ml), were not altered by GD. In the heat stress assay, GD did not alter standard worm survival. In the oxidative stress assay, hydrogen peroxide (H₂O₂) reduced the survival of *C. elegans*, as well as the number of pharyngeal pumping, and these effects were reversed by GD within 1h of exposure of L1 worms to H₂O₂ (50 µM/ml) and 2 and 3h after exposure to H₂O₂ in L4 (25 and 50 µM/ml). The in silico study did not indicate hepatotoxic, cardiotoxic, or mutagenic potential to GD.

In conclusion, GD showed low toxicity and a good antioxidant profile in both *in silico* and *in vivo* assays in *C. elegans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 GAMA-DECANOLACTONA	9
1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE <i>Caenorhabditis elegans</i>	12
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 ARTIGO CIENTÍFICO	17
4 DISCUSSÃO	47
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

Doenças neurológicas, incluindo as neurodegenerativas constituem potenciais problemas de saúde, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Sua incidência está aumentando dramaticamente junto com expectativa de vida. Essas doenças formam um grupo heterogêneo de transtornos crônicos e progressivos caracterizados pela degradação gradual de neurônios no sistema nervoso central, o que leva a déficits em funções cerebrais específicas. As doenças neurodegenerativas mais comuns são a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla e doença de Huntington. Embora suas etiologias ainda não tenham sido inteiramente resolvidas, de maneira que essas doenças compartilham características moleculares e celulares comuns, além de favorecer uma progressão, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, dobramento incorreto de proteínas, excitotoxicidade, desregulação do cálcio homeostase e inflamação. Atualmente não há abordagens terapêuticas para curar ou mesmo interromper a progressão dessas doenças, sendo os tratamentos existentes meramente paliativos (Angeloni; Vauzour, 2019; Van Bulk *et al.*, 2019).

A epilepsia é uma doença caracterizada por crises epiléticas imprevisíveis e recorrentes. Sua prevalência na população geral é de aproximadamente 1%, afetando pelo menos 70 milhões de pessoas no mundo. Sua prevalência na população geral é de aproximadamente 1%, afetando pelo menos 70 milhões de pessoas no mundo (Akyuz *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2016). Os fármacos disponíveis na terapêutica não satisfazem totalmente o tratamento dos pacientes com epilepsia, pois acabam por tratar apenas os sintomas e não os mecanismos fisiológicos envolvidos nesta doença, além disso, muitos pacientes são refratários ao tratamento ou sofrem com graves efeitos adversos (Amiri; Hansen, 2015).

Transtornos neurológicos têm um significativo impacto na sociedade, afetando não só o paciente, mas suas famílias e a sociedade em geral. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos que possam controlar os sintomas de forma mais efetiva ou até mesmo interferir diretamente no processo fisiopatológico, torna-se uma busca profícua.

Gama-decanolactona (GD) é uma lactona monoterpênica que demonstrou várias atividades em modelos animais. Em roedores mostrou efeito hipnótico, hipotérmico e anticonvulsivante (Coelho de Souza *et al.*, 1997). Mostrou-se neuroprotetora em diferentes modelos de crises epiléticas em camundongos, como crises induzidas por

pentilenotetrazol (PTZ), pilocarpina, isoniazida e 4-aminopiridina (de Oliveira *et al.*, 2008; Pflüger *et al.*, 2018). Demonstrou modular parâmetros inflamatórios e oxidativos, além de proteger danos induzidos ao DNA (Pflüger *et al.*, 2016).

A toxicidade de fármacos é uma questão crucial a ser considerada em qualquer tratamento farmacológico, especialmente no contexto de doenças do sistema nervoso central. Estudos têm demonstrado que a exposição a certos medicamentos pode resultar em efeitos adversos significativos, levando a danos nos órgãos-alvo e comprometendo a eficácia do tratamento (Bachur; Rabelo; Aragão, 2022; Ferreira *et al.*, 2021; Gouvêa *et al.*, 2022). Entender a toxicidade de compostos com potencial terapêutico é essencial para garantir a segurança e minimizar os riscos associados ao uso de medicamentos em humanos. Estudos pré-clínicos são conduzidos para investigar os efeitos adversos de fármacos em diferentes sistemas orgânicos. É importante ressaltar que a toxicidade dos fármacos pode ser dose-dependente, com doses excessivas levando a efeitos adversos graves (Matos *et al.*, 2018; Nogueira *et al.*, 2006; Secoli, 2010) Portanto, a determinação de doses terapêuticas adequadas, bem como a monitoramento de efeitos adversos são fundamentais para evitar a toxicidade e garantir a eficácia do tratamento.

Sendo assim, as avaliações toxicológicas dos fármacos é uma questão multifacetada que requer estratégias abrangentes de monitorização e gestão. Compreender os fatores que influenciam a toxicidade dos medicamentos, desde variáveis específicas do paciente até implicações ambientais, é crucial para garantir intervenções farmacológicas seguras e eficazes.

Desse modo, considerando a demanda de novos fármacos neuroprotetores, os efeitos farmacológicos demonstrados por GD e a escassez de dados toxicológicos sobre este composto, este trabalho teve como objetivo determinar o seu perfil de toxicidade no modelo experimental de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Para isso, GD foi avaliada em ensaios de sobrevivência e desenvolvimento, reprodução, concentração letal média (CL₅₀), termotolerância e resistência ao estresse oxidativo na linhagem selvagem N2 Bristol de *C. elegans*, bem como em ensaios *in silico*.

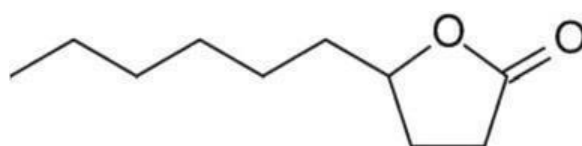
1.1 GAMA-DECANOLACTONA

Considerando os importantes efeitos adversos e a existência de pacientes epiléticos refratários, a pesquisa por tratamentos alternativos aos fármacos convencionais tem aumentado. Consequentemente, um dos grandes desafios enfrentados pela ciência é desenvolver fármacos eficazes e não tóxicos ao ser humano (Rates, 2001).

Dentre os compostos estudados para o tratamento de patologias do SNC estão as lactonas. Tais substâncias têm sido reconhecidas por suas propriedades neuroativas (Ferrendeli *et al.*, 1989; Holland *et al.*, 1992) dentre elas, efeitos anestésicos, anti-inflamatórios e hipnóticos (Duke, 1992; Viana *et al.*, 2007). GD é um composto sintético monoterpênico (figura 1) com estrutura química semelhante às lactonas presentes no óleo essencial da planta *Aeollanthus suaveolens* (Coelho de Souza *et al.*, 1997; Elisabetsky; Marschner; Souza, 1995; Pflüger *et al.*, 2016). Em modelos animais de depressão e ansiedade (nado forçado e labirinto em cruz elevada), os resultados sugeriram que GD não possui atividade do tipo antidepressiva e ansiolítica (Viana *et al.*, 2007). No modelo de *kindling* induzido por PTZ, considerado um importante modelo de epileptogênese, apresentou significativo efeito neuroprotetor, bem como atividade antigenotóxica, uma vez que reparou o dano ao DNA, induzido por PTZ (de Oliveira *et al.*, 2008).

Recentes estudos realizados por Pflüger *et al.* (2016), *in vitro*, demonstraram que GD atenuou a ativação de células microgliciais N9 induzidas por LPS, uma endotoxina, presente em bactérias gram-negativas, além disso, foi observada diminuição na expressão de marcadores inflamatórios como a enzima iNOS, TNF- α e inibição da formação de EROS nas células microgliciais. Nesse mesmo modelo GD bloqueou marcadores de apoptose como a fosforilação da p38 e ativação da caspase -9 clivada, diminuindo o dano causado ao DNA. Estes dados indicam que GD possui um potencial terapêutico neuroprotetor, e que exerce esse efeito por meio da inibição da neuroinflamação.

Figura 1. Estrutura química da Gama-decanolactona.



Fonte: Pflüger *et al.* (2016).

A avaliação neuroquímica, realizada por meio de ensaio de *binding* mostrou que GD foi capaz de inibir de forma dose dependente a união específica de L-[3H] -glutamato, ação que pode estar envolvida na atividade anticonvulsivante deste composto (Pereira *et al.*, 1997).

Em trabalhos mais recentes, GD reduziu crises agudas induzidas pelos agentes químicos isoniazida e 4-aminopiridina e foi capaz de proteger contra danos neuronais induzidos por pilocarpina (Pflüger *et al.*, 2018). A avaliação do mecanismo de ação de GD em modelo de crise epilética, utilizando antagonistas de receptores de adenosina A₁, A_{2A}

e antagonista de receptores de GABA_A, sugere que o efeito anticonvulsivante de GD pode estar relacionado à possível modulação dos receptores de adenosina A₁ (Pflüger *et al.*, 2020). Estudo publicado em 2021, sugere que GD poderia ser um fármaco com potencial utilidade na Doença de Parkinson (Pflüger *et al.*, 2021). Outra investigação demonstrou que GD, após 12 dias de tratamento de camundongos CF1, foi capaz de proteger contra danos ao DNA, reduzir a expressão de COX-2 e aumentar a expressão de GluN2B (Dos Santos *et al.*, 2021).

1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE *Caenorhabditis elegans*

C. elegans é um nematódeo de baixo custo de manutenção, vida útil curta (2-3 semanas), compartilhando muitas vias e mecanismos celulares conservados em mamíferos, incluindo humanos. Estas vantagens tornam esse nematódeo um modelo valioso para genética e triagem química e pesquisa pré-clínica. *C. elegans* é um nematódeo do solo, cilíndrico, não segmentado, não parasita, não patogênico e mede aproximadamente 1 mm de comprimento e 80 µm de diâmetro quando adulto (Brenner, 1974; Riddle *et al.*, 1997). Possui células musculares, hipoderme, cutícula, sistema nervoso, intestino, gônadas e sistema excretor (Artal-Sanz; De Jong; Tavernarakis, 2006). A maioria dos nematódeos são hermafroditas que se autofecundam, poucos são machos (~0,2%), e produzem muitos descendentes (300 a 1000 ovos por animal) (Brenner, 1974; Riddle *et al.*, 1997).

Após os ovos eclodirem, os nematódeos passam por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4; figura 2), pelo estágio adulto vivendo em média 2 a 3 semanas (se mantidos a 20°C) (Gruber; Ng; Poovathingal; Halliwell, 2009; Nelson; Raizen, 2013). O desenvolvimento é influenciado pela temperatura, com variação de cerca de 2 dias a 25°C a 6 dias a 15°C do ovo até a fase adulta (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). Em situações desfavoráveis, como aglomeração e escassez de alimentos, o desenvolvimento é interrompido no final do estágio larval, dando origem à larva dauer, e só é retomado quando as condições ambientais voltam a se tornar favoráveis (Golden; Riddle, 1984).

C. elegans tem seu corpo transparente, permitindo assim o emprego de técnicas não invasivas de visualização das estruturas celulares e de transcritos marcados com proteínas fluorescentes, mesmo que expressos em uma única célula. Desse modo, é possível o acompanhamento de processos biológicos como embriogênese, metabolismo lipídico, interação proteica e degeneração de neurônios no animal vivo (Boulin; Etchberger; Hobert, 2006; Chalfie *et al.*, 1994; Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

O cultivo de *C. elegans* é rápido, muitos descendentes são gerados e as cepas podem ser adquiridas apenas uma vez, podendo ser mantidas indefinidamente (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Riddle *et al.*, 1997).

É possível então, analisar com rapidez e com baixo custo muitas substâncias, incluindo extratos vegetais, quanto à toxicologia e/ou ao possível efeito farmacológico e investigar moléculas que alterem a expressão de um gene específico, por exemplo. (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Riddle *et al.*, 1997).

C. elegans se tornou um organismo modelo amplamente utilizado em pesquisas

biológicas. Desde a sua introdução como modelo experimental nos anos 1960 por Sydney Brenner, *C. elegans* tem sido fundamental para avanços em diversas áreas da biologia, incluindo genética, neurociência, biologia do desenvolvimento e envelhecimento. (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Leung *et al.*, 2008; Murakami, 2007; Riddle *et al.*, 1997; Zheng; Greenway, 2011).

Este nematódeo completa seu ciclo de vida em cerca de três dias e pode produzir centenas de descendentes, tornando-o ideal para estudos genéticos. *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular a ter o genoma completamente mapeado, em 1998 (*C. elegans* Genome Consortium, 1998). Foi estimado que 60 a 80% dos genes humanos possuam um ortólogo no genoma de *C. elegans* e, ainda, que a maioria dos genes e das vias de sinalização envolvidos em doenças humanas estejam presentes nesse nematódeo (Culetto; Sattelle, 2000; Kaletta; Hengartner, 2006). Na atualidade *C. elegans* é considerado uma poderosa ferramenta para diferentes estudos, incluindo aqueles relacionados à apoptose, à sinalização celular, ao estresse oxidativo, à regulação gênica, ao metabolismo, ao envelhecimento, à toxicologia e à modulação de doenças humanas (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Leung *et al.*, 2008; Murakami, 2007; Riddle *et al.*, 1997; Zheng; Greenway, 2011).

Com um sistema nervoso simples composto por 302 neurônios, *C. elegans* facilita o mapeamento completo das conexões neuronais. Estudos em *C. elegans* têm proporcionado insights valiosos sobre o funcionamento básico dos sistemas nervosos. A facilidade de manipulação genética em *C. elegans*, através de técnicas como RNAi (interferência por RNA), CRISPR/Cas9 e mutagênese química, permite a exploração de funções genéticas específicas e a investigação de vias de sinalização conservadas (Bargmann, 1998; Hobert, 2005; White *et al.*, 1976).

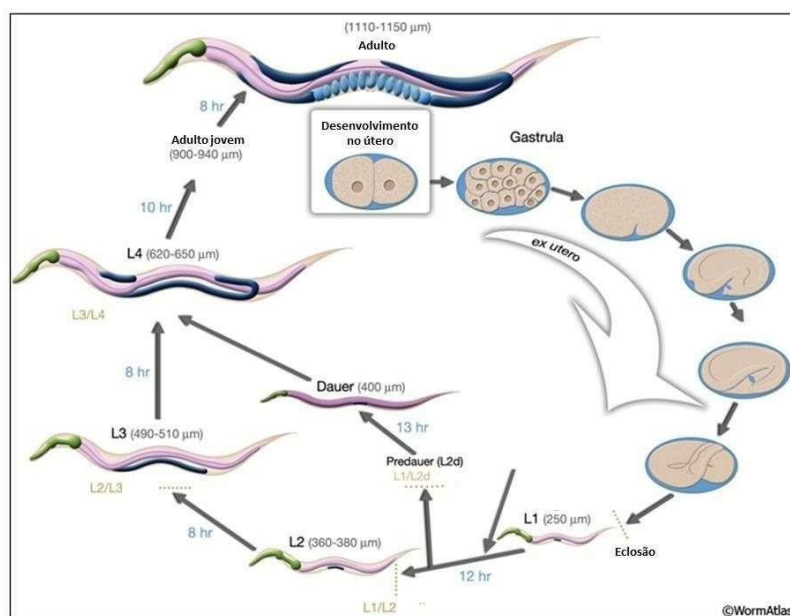
Pesquisas com este nematódeo identificaram muitos genes e vias metabólicas que influenciam a longevidade, desde modo *C. elegans* é amplamente utilizado em estudos sobre o envelhecimento em razão da sua vida útil curta e bem caracterizada.

Muitos genes humanos envolvidos em doenças têm homólogos em *C. elegans*. Estudos com este organismo ajudam na compreensão das bases genéticas e moleculares de doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes e câncer (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015; Leung *et al.*, 2008; Murakami, 2007; Riddle *et al.*, 1997; Zheng; Greenway, 2011).

Além de sua relevância em pesquisa básica, *C. elegans* tem aplicações em testes de toxicidade e em estudos de impacto ambiental. Sua simplicidade e a vasta quantidade de dados biológicos disponíveis fazem dele uma ferramenta poderosa para avaliação de efeitos de compostos químicos e condições ambientais.

C. elegans continua a ser um modelo essencial na pesquisa biológica, proporcionando uma compreensão detalhada dos processos fundamentais da vida. Sua utilização tem contribuído significativamente para o avanço do conhecimento científico e para o desenvolvimento de novas terapias e estratégias de tratamento para várias doenças humanas (Riddle *et al.*, 1997; Zheng; Greenway, 2011).

Figura 2 – Ciclo de vida de *C. Elegans*



Fonte: Altun; Hall (2009).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E *Caenorhabditis elegans*

O estresse oxidativo em *C. elegans* é um tema de grande interesse científico devido ao papel crucial das espécies reativas de oxigênio (EROs) na fisiologia e patologia desse organismo. *C. elegans*, um nematódeo amplamente utilizado como modelo de estudo, permite a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no estresse oxidativo e suas consequências celulares (Zheng *et al.*, 2020).

Segundo Zheng *et al.*, (2020), as EROs, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH), são produzidas em *C. elegans* tanto por reações enzimáticas quanto por processos não enzimáticos decorrentes do metabolismo aeróbico. Em condições normais, essas EROs desempenham funções importantes na sinalização celular e na regulação redox. No entanto, quando a produção de EROs supera a capacidade antioxidante do organismo, ocorre o estresse oxidativo, um estado que pode levar a danos significativos a biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, culminando em disfunção celular e morte (Zheng *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante da célula. Em *C. elegans*, os danos causados pelo estresse oxidativo incluem a peroxidação lipídica, que gera produtos como o malondialdeído (MDA), conhecido por sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana e comprometer a função enzimática. Além disso, o MDA pode reagir com o DNA, causando mutações que podem levar à carcinogênese (Zheng *et al.*, 2020).

As proteínas em *C. elegans* também são altamente suscetíveis aos danos oxidativos, que podem resultar em modificações estruturais e funcionais. A oxidação pode alterar a estrutura primária, secundária e terciária das proteínas, comprometendo sua função e aumentando a suscetibilidade à degradação proteolítica. As mitocôndrias, em particular, são um alvo crítico das EROs, e danos aos complexos mitocondriais podem levar a deficiências no metabolismo energético, aumentando a suscetibilidade do organismo ao estresse oxidativo (Zheng *et al.*, 2020).

Em resumo, o estudo do estresse oxidativo em *C. elegans* pode oferecer informações valiosas sobre os mecanismos subjacentes à regulação redox e os impactos celulares do desequilíbrio oxidativo, proporcionando um modelo robusto para a investigação de intervenções terapêuticas e estratégias de mitigação dos danos oxidativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o perfil de toxicidade de GD no modelo experimental de *C. elegans*.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Investigar a toxicidade de GD na linhagem selvagem N2 Bristol de *C. elegans* nos ensaios de:

- Concentração letal média (CL₅₀);
- Sobrevivência e desenvolvimento;
- Reprodução;
- Termotolerância;
- Bombeamento faríngeo;
- Estresse oxidativo.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Gamma-decanolactone increases stress resistance and improves toxicity parameters on the *Caenorhabditis elegans* alternative model” está submetido na revista Journal of Applied Toxicology.

4 DISCUSSÃO

GD é uma lactona monoterpênica que demonstrou diferentes efeitos em modelos farmacológicos pré-clínicos até o momento, sugerindo ser um composto bioativo promissor na epilepsia e na doença de Parkinson. No entanto, poucos estudos demonstraram seu perfil de toxicidade potencial. Assim sendo, este estudo foi conduzido no modelo alternativo de *C. elegans*, onde GD foi avaliada em um organismo inteiro *in vivo*, em diferentes parâmetros de toxicidade.

O primeiro passo neste estudo de avaliação do perfil toxicológico de GD foi a avaliação *in silico* deste composto. Foram realizados testes para estudo da toxicidade e dos potenciais efeitos associados à estrutura química de GD, utilizando ferramentas *in silico* e por meio da comparação com medicamentos anticonvulsivantes aplicados na prática clínica. Os resultados mostraram que GD não apresenta potencial hepatotóxico, cardiotoxico ou mutagênico, mostrando um bom perfil de segurança quando comparado com os fármacos padrões usados nos ensaios *in silico*.

Antes da avaliação nos diferentes ensaios de toxicidade, a CL_{50} foi calculada tratando os vermes com cinco concentrações de GD. Os resultados demonstraram que a letalidade foi dependente da concentração, com o valor de CL_{50} sendo 212,16 $\mu\text{M/ml}$ (após 24 h). Coelho de Souza *et al.* (1997) descreveram a avaliação farmacológica da GD em camundongos. Os resultados sugeriram um baixo potencial de toxicidade deste composto, com um valor de DL_{50} de 737,1 (536,3-1284,2) mg/kg (i.p.). É difícil estabelecer uma comparação precisa entre espécies e, além disso, os modelos orgânicos podem ter respostas diferentes. No entanto, hipoteticamente, por meio da alometria, pode-se usar a regra de Matthews, que estima a dose em uma espécie animal com base na dose eficaz em outra espécie, direcionando-se para uma abordagem translacional (Germovsek; Cheng; Giragossian, 2021). Com base na CL_{50} encontrada neste estudo para GD (212,16 $\mu\text{M/ml}$), teríamos 729,99 mg/kg (574,12 – 873,53 mg/kg). Portanto, considerando

estudos com GD em roedores, a CL_{50} encontrada em *C. elegans* indica um perfil de toxicidade semelhante.

Piper methysticum Frost F. é uma espécie de planta que se tornou popular no mundo ocidental como suplemento herbal para ansiedade e insônia (Fu *et al.*, 2008; Whitton *et al.*, 2003). Dezoito kavalactonas foram isoladas e identificadas do extrato da raiz de kava, sendo a dihidrometisticina (7,8-dihidrometisticina) e a dihidrokavaina (7,8-dihidrokavaina) os compostos majoritários. Os valores de DL_{50} para esses compostos em camundongos foram 420 e 325 mg/kg, respectivamente (Fu *et al.*, 2008). Esses dados comparados aos valores de DL_{50} encontrados por Coelho de Souza *et al.* (1997) para GD em camundongos, bem como pelo cálculo baseado na CL_{50} em *C. elegans* (regra de Matthew), demonstram uma baixa toxicidade de GD em diferentes espécies.

Para a avaliação de GD nos demais ensaios de toxicidade, foram testadas três concentrações abaixo da CL_{50} (25, 50 e 100 μ M/ml). No ensaio de sobrevivência, GD foi avaliada nos estágios L1 e L4 dos vermes, em 24 e 72h. Em 24h, GD nas concentrações de 50 e 100 μ M/ml reduziu significativamente a sobrevivência dos vermes nos estágios L1 e L4. Da mesma forma, em 72h, no estágio L1. Em 72h, GD nas três concentrações testadas afetou a sobrevivência dos vermes de maneira dependente da concentração. Os resultados sugerem que GD pode afetar a sobrevivência dos vermes de maneira dependente da concentração, com a redução mais significativa ocorrendo 72h após a exposição ao composto. Os ensaios de sobrevivência em *C. elegans* são ferramentas importantes para estudar diferentes processos biológicos, como envelhecimento, resistência ao estresse e imunidade, e são indicadores diretos de toxicidade aguda (Park; Jung; Lee, 2017). Neste estudo, foi observado que em 24h, GD afeta de forma semelhante a sobrevivência dos vermes em L1 e L4. No entanto, após 72 horas de exposição, GD demonstra maior toxicidade.

Outro parâmetro de toxicidade utilizado para verificar potenciais efeitos tóxicos de GD foi a avaliação do desenvolvimento dos vermes, que foi monitorado através da medição da área corporal. Este ensaio serve como um bom parâmetro para avaliar os efeitos tóxicos de compostos em *C. elegans*, considerando que o crescimento deste nematódeo é determinado por uma via regulatória genética conservadora (Soares *et al.*, 2019). Os resultados mostram que as três concentrações de GD testadas não alteraram o tamanho dos vermes, sugerindo que não afeta o desenvolvimento dos vermes. *C. elegans*, que tem cerca de 1 mm de comprimento quando adulto, pode ser cultivado facilmente por múltiplas gerações, permitindo a identificação de compostos que interferem qualquer ponto do seu ciclo de vida e servindo como indicador de toxicidade (Sant'anna *et al.*, 2013).

Neste estudo, o efeito de GD na progênie da linhagem N2 foi avaliado. GD, nas três concentrações testadas, não alterou o potencial reprodutivo dos vermes. Sabe-se que algumas lactonas macrocíclicas inibem a reprodução dos nematódeos, diminuindo o número de descendentes na população tratada. A lactona ivermectina foi avaliada no modelo experimental de *C. elegans* usando ensaio de desenvolvimento larval. Os vermes foram expostos à ivermectina em concentrações de 1 ng/mL a 10 ng/mL e foram monitorados por 24, 48, 72 e 96 horas até os vermes se tornarem adultos. Os resultados demonstraram que o crescimento da linhagem N2 foi significativamente reduzido devido ao aumento da concentração de ivermectina (Zain; Yahaya; Him, 2016). Os dados obtidos aqui mostraram que GD não afeta a reprodução de *C. elegans*, nas concentrações testadas. Porém, outros parâmetros de avaliação reprodutiva precisam ser investigados para uma melhor definição do potencial tóxico de GD.

De acordo com nossos resultados, GD não alterou a bomba faríngea dos vermes em nenhuma concentração testada. Este é um fato importante, pois a bomba faríngea é um

processo complexo envolvendo respostas miogênicas com regulação neurogênica que estão bem estabelecidas. Sendo um indicador importante da saúde e sobrevivência do animal, é suscetível a agentes ambientais e danos induzidos por diferentes tipos de estresse e compostos (Trojanowski; Raizen; Fang-Yen, 2016). GD não afetou os parâmetros de toxicidade nos ensaios de desenvolvimento, reprodução e bomba faríngea, mesmo na concentração de 100 $\mu\text{M/ml}$, a mais próxima da CL_{50} calculada (212,16 $\mu\text{M/ml}$), sugerindo um bom perfil de toxicidade em *C. elegans*.

Para avaliar se GD confere tolerância ao estresse térmico em *C. elegans*, vermes adultos jovens (L4) foram expostos à GD e depois incubados a uma temperatura letal (37 °C). Neste ensaio, pode-se observar que o tempo de exposição ao estresse térmico reduz a sobrevivência dos vermes de maneira dependente do tempo. No entanto, os grupos tratados com GD não demonstraram aumento na sobrevivência dos vermes em comparação com o grupo controle, nos respectivos tempos de exposição.

Vermes N2 nos estágios L1 e L4 foram expostos ao H_2O_2 por 1, 2 ou 3 horas (figura 8). O grupo que recebeu apenas H_2O_2 mostrou diferença significativa do controle negativo em todos os tempos testados, tanto no estágio L1 quanto no L4 ($p \leq 0,05$). Os grupos tratados com H_2O_2 e GD não mostraram diferença no controle positivo, exceto pela concentração de 50 $\mu\text{M/ml}$ em 2 e 3 h de exposição. Por outro lado, no estágio L4, tanto o grupo GD 25 quanto 50 $\mu\text{M/ml}$ aumentaram a sobrevivência, mesmo sob estresse oxidativo nos dois tempos avaliados (2 e 3 h). Esses resultados sugerem que vermes em diferentes estágios de desenvolvimento têm respostas diferentes à exposição a oxidantes, o que pode ser importante na definição de estratégias específicas de investigação futura.

Pflüger *et al.* (2016) examinaram o efeito de GD na formação de espécies reativas de oxigênio intracelular em células N9. Os achados mostraram que GD suprimiu a produção de espécies reativas de oxigênio de maneira dependente da dose. Além disso,

sabe-se que o efeito de compostos antioxidantes na eliminação de radicais DPPH está envolvido com seu potencial para doar um átomo de hidrogênio. Pflüger *et al.* (2016) também demonstraram que GD não apresentou efeitos eliminadores de radicais DPPH, sugerindo que o mecanismo antioxidante de GD pode não estar relacionado à sua capacidade de doar um elétron ou radical hidrogênio. Portanto, os dados obtidos neste estudo com *C. elegans* corroboram o estudo anterior, mostrando que GD, mesmo em concentrações que reduziram a sobrevivência dos vermes, demonstra potencial antioxidante.

A alimentação de *C. elegans* ocorre através da faringe. A bomba faríngea é essencial para a alimentação dos vermes quando estão na presença de bactérias (Izquierdo *et al.*, 2021). A taxa de bombeamento faríngeo é controlada cooperativamente pelos músculos faríngeos e neurônios associados, que estão amplamente isolados do sistema nervoso somático (Bruns; Lo, 2020). Antioxidantes reduzem a extensão dos danos oxidativos mediados por radicais livres e restauram diferentes funções fisiológicas em *C. elegans*, como o bombeamento faríngeo. Neste estudo, a exposição ao meio contendo concentrações de peróxido de hidrogênio resultou em uma diminuição substancial no bombeamento faríngeo dos vermes. Por outro lado, GD, nas três concentrações testadas, mostrou proteção contra danos induzidos por H₂O₂ no bombeamento faríngeo dos vermes.

Pflüger *et al.* (2018) relataram que GD, em um modelo de convulsões epiléticas induzidas por pilocarpina em camundongos, foi capaz de aumentar as atividades de superóxido dismutase e catalase, induzindo uma diminuição na produção de ROS e nitrito e nos danos ao DNA no córtex cerebral. Além disso, GD atenuou a ativação de células N9 e inibiu espécies reativas de oxigênio intracelulares e a expressão de iNOS e TNF- α induzida por lipopolissacarídeo (LPS) nas células. Neste estudo, GD modulou a expressão

de *sod-3*, *ctl-1,2,3* e *gst-4*, tanto em condições normais quanto em condição de estresse. sugerindo Desse modo, considerando os resultados de GD relatados em estudos anteriores, bem como os dados apresentados aqui, o mecanismo pelo qual ela aumentou o bombeamento faríngeo em *C. elegans* após a exposição ao H₂O₂ possivelmente esteja relacionado ao seu efeito antioxidante. Este mecanismo será melhor avaliado em trabalhos futuros, onde as vias DAF-2, DAF-16 e SKN-1 serão consideradas.

C. elegans representa um organismo modelo muito útil para estudos de toxicidade para pré-triagem de novos fármacos. Porém, existem algumas limitações como não possuir alguns órgãos de mamíferos, como pulmões, coração, rins e fígado. Ainda, alterações de temperatura e umidade podem alterar diferentes condições de cultivo dos vermes e alterar os resultados dos ensaios, o que requer condições bem definidas de experimentação (Soares *et al.*, 2019). Outra limitação encontrada neste estudo foi a solubilidade de GD, uma vez que este composto não é solúvel em água, sendo necessário o uso de DMSO e a avaliação de um grupo adicional.

Este trabalho foi o primeiro a avaliar diferentes parâmetros de toxicidade de GD em um organismo inteiro. Os dados obtidos aqui poderão guiar novas investigações e indicar concentrações seguras para futuras avaliações de GD em modelos experimentais farmacológicos, tanto em invertebrados como vertebrados. GD mostrou um bom perfil de segurança nos testes realizados, corroborando com a ideia de ser um potencial fármaco para o tratamento de doenças do SNC.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKYUZ, E. *et al.* Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. **Life Sciences**, v. 265, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33259863/>. Acesso em: 15 mar. 2024.

ALTUN, Z.F; HALL, D. H. Introduction. **WormAtlas**, 2009. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>. Acesso em: 04 jun. 2024.

AMIRI, M.; HANSEN, C.P. The interictal dysphoric disorder in patients with epilepsy: A doubtful disorder lacking diagnostic tools. **Seizure**, v. 24, p. 70-76, Jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.08.009>. Acesso em: 10 abr. 2024.

ANGELONI, C.; VAUZOUR, D. Natural Products and Neuroprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, Nov. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5570>. Acesso em: 20 mai. 2024.

ARTAL-SANZ, M.; DE JONG, L.; TAVERNARAKIS, N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 12, p. 1405-1418, Dec. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109493>. Acesso em: 09 mar. 2024.

BARGMANN, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2028–2033, Dec. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9851919/>. Acesso em: 09 mai. 2024.

BACHUR, T.; RABELO, F.; ARAGÃO, J. Manejo de doenças crônicas degenerativas e depressão: desafios da polifarmácia. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 15, n. 2, p. 43-58, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.22280/revintervol15ed2.520>. Acesso em: 05 abr. 2024.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, May 1974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4366476/>. Acesso em: 25 mar. 2024.

BOULIN, T.; ETCHBERGER, J. F.; HOBERT, O. Reporter gene fusions. **WormBook: the online review of C. elegans biology**, p. 1-23, Apr. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050449>. Acesso em: 10 abr. 2024.

BRUNS, A. N.; LO, S. H. Tensin regulates pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 522, n. 3, p. 599–603, Nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.153>. Acesso em: 10 jun. 2024.

C. **ELEGANS** SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, New York, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, Dec.1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>. Acesso em: 01 jun. 2024.

CHALFIE, M. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303295>. Acesso em: 13 abr. 2024.

COELHO DE SOUZA, G. P. *et al.* Anticonvulsant properties of gamma-decanolactone in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 3, p. 175-181, Nov. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9421253/>. Acesso em: 12 mar. 2024.

CORSI, A.K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, Sept. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26088431/>. Acesso em: 04 mai. 2024.

CULETTO, E.; SATTELLE, D.B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human Molecular Genetics**, v.9, n. 6, p. 869-877, Apr. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767309>. Acesso em: 02 mar. 2024.

DE OLIVEIRA, P. A. *et al.* Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. **Experimental Brain Research**, v. 187, n. 1, p. 161-166, Feb. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1295-y>. Acesso em: 01 mai. 2024.

DOS SANTOS, Fernanda M. *et al.* Gamma-Decanolactone Alters the Expression of GluN2B, A 1 Receptors, and COX-2 and Reduces DNA Damage in the PTZ-Induced Seizure Model After Subchronic Treatment in Mice. **Neurochemical research**, v. 46, n. 8, p. 2066–2078, May 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11064-021-03345-7>. Acesso em: 02 jun. 2024.

DUKE, J.A. **Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1992.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D. O. Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 20, n. 4, p. 461–465, Apr. 1995. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00973103>. Acesso em: 18 mar. 2024.

FERRENDELLI, J. A.; HOLLAND, K. D.; MCKEON, A. C.; COVEY, D. F. Comparison of the anticonvulsant activities of ethosuximide, valproate, and a new anticonvulsant, thiobutyrolactone. **Epilepsia**, v. 30, n. 5, p. 617–622, Sept. /Oct. 1989. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1157.1989.tb05482.x>. Acesso em: 01 jun. 2024.

FERREIRA, F.; DE LUNA, G.G.; IZEL, I. C. M.; DE ALMEIDA, A. C. G. O impacto da prática da automedicação no Brasil: Revisão Sistemática/ The impact of the practice of self-medication in Brazil: Systematic Review. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, n. 3, p. 1505-1518, jun. 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BASR/article/view/31242>. Acesso em: 01 abr. 2024.

FU, P. P.; XIA, Q.; GUO, L.; YU, H.; CHAN, P. C. Toxicity of kava kava. **Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews**, v. 26, n. 1, p. 89-112, Jan. /Mar. 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1080/10590500801907407>. Acesso em: 14 mar. 2024.

GERMOVSEK, E.; CHENG, M.; GIRAGOSSIAN, C. Allometric scaling of therapeutic monoclonal antibodies in preclinical and clinical settings. **MAbs**, v.13, n.1, Jan. /Dec. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1964935>. Acesso em: 03 mai. 2024.

GOLDEN, J. W.; RIDDLE, D. L. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. **Developmental Biology**, v. 102, n. 2, p. 368–378, Apr. 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90201-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90201-x). Acesso em: 11 mai. 2024.

GOUVÊA, T.A.; CHAVES, G.V.; SOBREIRA-DA-SILVA, M.J. Análise de toxicidades relacionadas ao protocolo carboplatina e paclitaxel em pacientes com câncer de ovário. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 3, jul/set. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.30968/rbfhss.2022.133.0823_ Acesso em: 14 mar. 2024.

GRUBER, J; NG, L.F; POOVATHINGAL, S.K.; HALLIWELL, B. Deceptively simple but simply deceptive--*Caenorhabditis elegans* lifespan studies: considerations for aging and antioxidant effects. **FEBS Letters**, v. 583, n. 21, p. 3377-3387, Nov. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19815017>. Acesso em: 02 jun. 2024.

HOBERT, O. Specification of the nervous system. **WormBook: the online review of C. elegans biology**, p. 1-19, Aug. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050401>. Acesso em: 02 mar. 2024.

HOLLAND, K.D. *et al.* Relative anticonvulsant effects of GABA mimetic and GABA modulatory agents. **Epilepsia**, v.33, n. 6, p.981–986, Nov. /Dec. 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01747.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 12 jun. 2024.

IZQUIERDO, P.G.; O'CONNOR, V.; GREEN, A.C.; HOLDEN-DYE, L.; TATTERSALL, J.E.H. *C. elegans* pharyngeal pumping provides a whole organism bioassay to investigate anti-cholinesterase intoxication and antidotes. **Neurotoxicology**, v. 82, p. 50-62, Jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33176172/>. Acesso em: 02 jun. 2024.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-398, May. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672925>. Acesso em: 08 mai. 2024.

LEUNG, M. C. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicological sciences: an official journal of the**

Society of Toxicology, v. 106, n. 1, p. 5-28, Nov.2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566021>. Acesso em: 23 mai. 2024.

LOPES, M. W. *et al.* Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior: E&B**, v. 55, p. 92–100, Feb. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2015.12.001>. Acesso em: 09 mar. 2024.

MATOS, J. *et al.* Prevalência, perfil e fatores associados à automedicação em adolescentes e servidores de uma escola pública profissionalizante. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 76-83, jan./mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1414-462x201800010351>. Acesso em: 07 mai. 2024.

MURAKAMI, S. *Caenorhabditis elegans* as a model system to study aging of learning and memory. **Molecular neurobiology**, v. 35, n. 1, p. 85–94, Feb. 2007. <https://doi.org/10.1007/BF02700625>

NELSON, M. D.; RAIZEN, D. M. A sleep state during *C. elegans* development. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 5, p. 824–830, Oct. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.015>. Acesso em: 05 jun. 2024.

NOGUEIRA, B.F.; ALMEIDA, C.R.; OJOPI, E.P.B. Farmacogenética de doenças neurológicas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 39, n. 4, p. 562–569, dez. 2006. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/407>. Acesso em: 02 mar. 2024.

PARK, H.H.; JUNG, Y.; LEE, S.V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and cells**, v. 40, n. 2, p. 90-99, Feb. 2017. Disponível em: <http://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>. Acesso em: 06 mar. 2024

PEREIRA, P.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D.O. Effect of gamma-decanolactone on glutamate binding in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v. 22, n. 12, p. 1507–1510, Dec. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1021962714034>. Acesso em: 23 mar. 2024.

PFLÜGER, P. *et al.* Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 38–45, June 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.029>. Acesso em: 22 mai. 2024.

PFLUGER, P. *et al.* Gamma-Decanolactone Improves Biochemical Parameters Associated with Pilocarpine-Induced Seizures in Male Mice. **Current Molecular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 162–169, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1874467210666171002114954>. Acesso em: 19 mar. 2024.

PFLÜGER, P. *et al.* Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice: a possible role of adenosine A1 receptors. **Behavioural Pharmacology**, v. 31, n. 6, p. 544–552, Sept. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000554>. Acesso em: 27 abr. 2024.

PFLÜGER, P. *et al.* Gamma-decanolactone: Preliminary evaluation as potential antiparkinsonian drug. **European Journal of Pharmacology**, v. 906, Sept. 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2021.174276>. Acesso em: 09 mar. 2024.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, May. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11072038/>. Acesso em: 10 mai.

RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R. Introduction to *C. elegans*. In: RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R. **C. elegans II**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

SANT'ANNA, V.; VOMMARO, R. C.; DE SOUZA, W. *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 1–8, Sept. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727123/>. Acesso em: 08 mai. 2024.

SECOLI, S. Polifarmácia: interações e reações adversas no uso de medicamentos por idosos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n.1, p. 136-140, jan. /fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0034-71672010000100023>. Acesso em: 29 mai. 2024.

SOARES, F.G.N. *et al.* Novel coumarins active against *Trypanosoma cruzi* and toxicity assessment using the animal model *Caenorhabditis elegans*. **BMC Pharmacology & Toxicology**, v. 20, n. 76, Dec. 2019. Supl.1. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s40360-019-0357-z>. Acesso em: 02 jun. 2024.

TROJANOWSKI, N. F.; RAIZEN, D. M.; FANG-YEN, C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. **Scientific Reports**, v. 6, Mar. 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/srep22940>. Acesso em: 06 mar. 2024.

VAN BULCK, M. *et al.* Novel Approaches for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences** v. 20, n. 3, Feb. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20030719>. Acesso em: 06 mar. 2024.

VIANA, C. C. S. *et al.* Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. **Life Sciences**, v. 80, n. 11, p. 1014–1019, Feb. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2006.11.042>. Acesso em: 12 abr. 2024.

WHITE, J. G.; SOUTHGATE, E.; THOMSON, J.N.; BRENNER, S. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 275, n. 938, p. 327-348, Aug. 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806>. Acesso em: 22 abr. 2024.

WHITTON, P.A. *et al.* Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 673-679, Oct. 2003. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00381-9](http://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00381-9). Acesso em: 06 mai. 2024.

ZAIN, M.M.; YAHAYA, Z. S.; HIM, N. A. The Effect of Macrocyclic Lactones-Ivermectin Exposure on Egg Hatching and Larval Development of *Caenorhabditis*

elegans. **Tropical Life Sciences Research**, v. 27, n 1, p. 3-8, Nov. 2016. Supl.1. Disponível em: <http://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.3.1>. Acesso em: 03 jun. 2024.

ZHENG, F. *et al.* Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. **Redox Biology**, v. 34, July. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336668/>. Acesso em: 02 jun. 2024.

ZHENG, J.; GREENWAY, F. L. *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 2, p. 186–194, May; 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.93>. Acesso em: 07 abr. 2024.