



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE BACHARELADO EM FÁRMACIA**

**VINÍCIUS DA SILVA MARREIRO**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA *IN VIVO* DO DERIVADO DA  
ISATINA 2-(3-HIDROXI-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (ISACN) EM  
MODELO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS***

**JOÃO PESSOA – PB  
2024**

**Vinícius da Silva Marreiro**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA *IN VIVO* DO DERIVADO DA  
ISATINA 2-(3-HIDROXI-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (ISACN) EM  
MODELO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Daniele Idalino Janebro Ximenes

**Coorientador:** Me. Igor Gabriel da Silva Ramalho

João Pessoa – PB

Outubro/2024

**Catalogação na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

M358a Marreiro, Vinícius da Silva.

Avaliação da toxicidade não clínica in vivo do derivado da isatina 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) em modelo de *Caenorhabditis elegans* / Vinícius da Silva Marreiro. - João Pessoa, 2024.

47 f. : il.

Orientadora : Daniele Idalino Janebro Ximenes.

Coorientador : Igor Gabriel da Silva Ramalho.

TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. Isatina. 3. ISACN. 4. Toxicidade. I. Ximenes, Daniele Idalino Janebro. II. Ramalho, Igor Gabriel da Silva. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 595.1

## VINÍCIUS DA SILVA MARREIRO

### AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO CLÍNICA *IN VIVO* DO DERIVADO DA ISATINA 2-(3-HIDROXI-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (ISACN) EM MODELO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Aprovado em 02 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente  
 DANIELE IDALINO JANE BRO XIMENES  
Data: 08/10/2024 14:42:35-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

**Orientadora – Profa. Dra. Daniele Idalino Janebro Ximenes**

**Universidade Federal da Paraíba – UFPB**

Documento assinado digitalmente  
 IGOR GABRIEL DA SILVA RAMALHO  
Data: 08/10/2024 13:18:20-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

**Coorientador – Me. Igor Gabriel da Silva Ramalho**

**Universidade Federal da Paraíba – UFPB**

Documento assinado digitalmente  
 HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES  
Data: 08/10/2024 17:15:46-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

**Examinador I – Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães**  
**Universidade Federal da Paraíba – UFPB**

Documento assinado digitalmente  
 MARIA LUIZA FASCINELI  
Data: 08/10/2024 19:17:12-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

**Examinador II – Profa. Dra. Maria Luiza Fascineli**  
**Universidade Federal da Paraíba – UFPB**

**João Pessoa – PB**

**2024**

## RESUMO

A síntese orgânica tornou-se fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos, permitindo a criação de moléculas complexas com diversas propriedades terapêuticas. Avanços na química medicinal têm revolucionado a farmacologia, nesse contexto um dos destaques são os compostos heterocíclicos, que são estruturas facilmente passíveis de modificações químicas, permitindo inserção de grupamentos orgânicos com as mais variadas finalidades. Entre eles, os derivados da isatina se destacam como candidatos promissores a novos fármacos, esses que já tem diferentes atividades farmacológicas relatadas na literatura. Estudos preliminares, como testes de toxicidade, são essenciais para o desenvolvimento de novas moléculas candidatas a medicamentos, garantindo segurança para um possível teste em humanos. Dessa forma, modelos alternativos como o *Caenorhabditis elegans* têm ganhado relevância por otimizar custos e reduzir o número e uso de animais. Este nematoide, com um ciclo de vida curto e ampla distribuição, compartilha 60-80% dos genes humanos, muitos relacionados a doenças, tornando-o ideal para pesquisas toxicológicas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do derivado da isatina 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) utilizando esse modelo animal, seguindo metodologias de estudo definidas para essa espécie. Portanto, ao avaliar alguns parâmetros foi possível concluir que o derivado ISACN não reduziu a taxa de eclosão de ovos de *C. elegans*, bem como também não foi capaz de alterar a quantificação de batimentos faríngeos, parâmetro esse que se relaciona com a capacidade alimentar do nematoide. Após tratamento com a concentração mais alta testada foi possível observar um aumento do padrão de motilidade do animal. Por fim, não foi possível observar alterações nos ensaios de desenvolvimento corporal e análise morfológica dos animais tratados com o derivado da isatina, concluindo que a substância possui baixa toxicidade, nas concentrações testadas, frente ao nematoide. Corroborando com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, onde avaliou-se a toxicidade *in vivo* desse derivado e o mesmo recebeu classificação GHS 4, indicativo de baixa toxicidade.

**Palavras-chave:** *Caenorhabditis elegans*; Isatina; ISACN; toxicidade.

## ABSTRACT

Organic synthesis has become essential for the development of new drugs, allowing the creation of complex molecules with diverse therapeutic properties. Advances in medicinal chemistry have revolutionized pharmacology, and in this context, one of the highlights are heterocyclic compounds, which are structures that are easily amenable to chemical modifications, allowing the insertion of organic groups for a wide variety of purposes. Among them, isatin derivatives stand out as promising candidates for new drugs, which already have different pharmacological activities reported in the literature. Preliminary studies, such as toxicity tests, are essential for the development of new drug candidate molecules, ensuring safety for possible testing in humans. Thus, alternative models such as *Caenorhabditis elegans* have gained relevance for optimizing costs and reducing the number and use of animals. This nematode, with a short life cycle and wide distribution, shares 60-80% of human genes, many related to diseases, making it ideal for toxicological research. Thus, the present study aimed to evaluate the toxicity of the isatin derivative 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) using this animal model, following study methodologies defined for this species. Therefore, by evaluating some parameters, it was possible to conclude that the ISACN derivative did not reduce the hatching rate of *C. elegans* eggs, nor was it able to alter the quantification of pharyngeal beats, a parameter that is related to the nematode's feeding capacity. After treatment with the highest concentration tested, it was possible to observe an increase in the animal's motility pattern. Finally, it was not possible to observe changes in the body development tests and morphological analysis of the animals treated with the isatin derivative, concluding that the substance has low toxicity, at the concentrations tested, against the nematode. Corroborating previous studies by our research group, where the *in vivo* toxicity of this derivative was evaluated and it received a GHS 4 classification, indicating low toxicity.

**Keywords:** *Caenorhabditis elegans*; Isatin; ISACN; toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estruturas do núcleo indol e da isatina .....	12
<b>Figura 2</b> – Exemplos de derivados da Isatina com importância biológica.....	13
<b>Figura 3</b> – Uso de modelos alternativos de 1990 a 2015 .....	15
<b>Figura 4</b> – Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	16
<b>Figura 5</b> – Anatomia de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	17
<b>Figura 6</b> – Estrutura do derivado ISACN .....	22
<b>Figura 7</b> – Percentual de ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i> eclodidos após 24 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.....	30
<b>Figura 8</b> – Quantificação de flexões corporais de <i>Caenorhabditis elegans</i> após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.....	32
<b>Figura 9</b> – Batimentos faríngeos de <i>Caenorhabditis elegans</i> após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações .....	34
<b>Figura 10</b> – Crescimento corporal em $\mu\text{m}$ de <i>Caenorhabditis elegans</i> após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.....	35
<b>Figura 11</b> – Análise morfológica da extremidade anterior de <i>Caenorhabditis elegans</i> após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações .....	37
<b>Figura 12</b> – Análise morfológica de <i>Caenorhabditis elegans</i> após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>3R's</b>	Redução, Refinamento e Substituição
<b>BOD</b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>C. elegans</b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>CPG</b>	Condroitina Proteoglicana
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E. Coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>IPEFARM</b>	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
<b>ISACN</b>	2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
<b>LABETOX</b>	Laboratório de Ensaios Toxicológicos
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LGB</b>	Laboratório de Genética Bioquímica
<b>NGM</b>	Nematode Growth Medium
<b>RMBH</b>	Reação de Morita-Baylis-Hillman
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>11</b>
2.1	Síntese orgânica.....	11
2.2	Isatina e seus derivados .....	11
2.3	Toxicologia e modelos alternativos .....	14
2.4	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	15
2.5	Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	17
2.6	<i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental.....	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1	Objetivo geral.....	21
3.2	Objetivos específicos .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
4.1	Locais de pesquisa .....	22
4.2	Substância teste .....	22
4.6	Ensaio de eclosão de ovos.....	24
4.7	Ensaio de motilidade .....	25
4.8	Ensaio de quantificação de batimentos faríngeos.....	26
4.9	Ensaio de desenvolvimento corporal .....	26
4.10	Ensaio de análise de morfologia.....	27
4.11	Análises estatísticas .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
5.1	Ensaio de eclosão de ovos.....	29
5.2	Ensaio de motilidade .....	31
5.3	Ensaio de quantificação de batimentos faríngeos.....	33
5.4	Ensaio de desenvolvimento corporal .....	35
5.5	Ensaio de análise morfológica .....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A síntese orgânica e o desenvolvimento de moléculas sintéticas desempenham um papel central na farmacologia moderna e na promoção da saúde humana. Esses processos são essenciais, pois oferecem maior controle sobre a criação de compostos químicos, possibilitando a manipulação precisa de suas características, o que permite a modificação de fatores como atividade biológica e biodisponibilidade de diferentes moléculas (Mohammadi *et al.*, 2018).

Ao longo dos anos com inovações e aperfeiçoamentos na área da química medicinal, a busca por novos medicamentos é crescente. Os compostos heterocíclicos representam uma parcela importante das substâncias sintéticas que são produzidas e estudadas como protótipos à fármacos, estes possuem uma estrutura privilegiada, sendo muito passíveis de alterações químicas com as mais diversas finalidades (Rotella *et al.*, 2016).

Dentre os mesmos compostos, os derivados da isatina se destacam por apresentarem diversas atividades farmacológicas já descritas na literatura, entre elas a atividade antitumoral. Neste contexto, o derivado 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) é uma molécula com grande potencial, obtida por uma reação de adição conhecida como Reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH), que resulta na formação de compostos poli-funcionalizados. Essa reação ocorre em cerca de 20 minutos e tem um rendimento médio em torno de 99% (Lima-Junior *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2020).

Dado o potencial dos derivados da isatina como possíveis novos fármacos, faz-se necessário a realização de uma série de estudos não clínicos com essas moléculas, incluindo os de toxicidade, visando garantir o máximo de segurança no uso das substâncias antes de prosseguir para uma possível etapa clínica. Atualmente, a pesquisa dispõe de diversos modelos para testes em toxicologia, estudos com roedores continuam sendo padrão, contudo, objetivando otimizar tempo e reduzir custos e sofrimento animal em estudos, abordagens *in vitro* ou modelos alternativos de animais invertebrados estão ganhando significância nos estudos toxicológicos iniciais, sendo ótimas alternativas para triagem de substâncias. (Freires *et al.*, 2016; Augsten, 2022; Henke *et al.*, 2024).

Dentro das possibilidades de modelos alternativos em uso, destaca-se o

nematoide *Caenorhabditis elegans*, sendo amplamente distribuído por todo o mundo, essa espécie prefere ambientes úmidos e com temperaturas amenas. Na natureza, habita o solo ou matéria vegetal em decomposição, que são locais adequados para a obtenção de sua principal fonte de alimento, microrganismos, especialmente as bactérias. Seu ciclo de vida é relativamente curto; em condições ideais de temperatura (20°C), ele passa do estágio de ovo à fase adulta em cerca de 3 dias. As larvas recém-eclodidas medem aproximadamente 0,25 milímetros de comprimento, enquanto os adultos atingem até 1 milímetro (Ruszkiewicz *et al.*, 2018; Kuwahara *et al.*, 2021).

*Caenorhabditis elegans* apresenta diversas características que o tornam um modelo alternativo promissor para pesquisas científicas. Como o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado, verificou-se que 60-80% dos genes humanos possuem ortólogos no genoma de *C. elegans*. Além disso, muitos genes conhecidos por estarem relacionados a doenças humanas também têm ortólogos neste organismo, o que torna as descobertas obtidas em estudos com *C. elegans* interessantes para a investigação de doenças humanas, sendo possível realizar comparativos com o modelo. (Kaletta *et al.*, 2006; Mitani *et al.*, 2017).

Portanto, visando a relevância de contribuir com mais estudos acerca dos derivados da isatina, uma vez que esses são promissores candidatos a fármacos, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a toxicidade de 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) em modelo animal de *Caenorhabditis elegans*, para isso foram analisados diferentes parâmetros de toxicidade que são preconizados para estudos com essa espécie.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Síntese orgânica**

Produtos naturais ainda são a principal fonte para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, tanto no uso de fitoterápicos, quanto para isolamento de moléculas. Entretanto, o processo de isolamento dessas substâncias a partir de fontes naturais, por vezes, é lento e possui um baixo rendimento, assim elevando o tempo e dificultando a pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas. Nesse contexto, as substâncias sintéticas se tornam relevantes no planejamento de novos medicamentos (Najmi *et al.*, 2022).

A síntese orgânica desempenha um papel fundamental na descoberta de novos fármacos, permitindo a criação de moléculas complexas de forma eficiente e controlada. Ao longo do tempo, avanços na área da química medicinal foram responsáveis por revolucionar a farmacologia, possibilitando a síntese de compostos com propriedades terapêuticas diversas, que muitas vezes são inspirados em produtos naturais (Rotella *et al.*, 2016).

Além de reduzir o tempo para obtenção de moléculas, a rota sintética ainda garante um melhor rendimento e possibilita uma gama de alterações estruturais, melhorando aspectos como estabilidade, biodisponibilidade, toxicidade e eficácia desses produtos. Tornando assim a síntese orgânica peça fundamental no desenvolvimento de fármacos na atualidade (Munnangi *et al.*, 2023).

Um dos destaques da síntese orgânica são os compostos heterocíclicos, esses que possibilitam a formação de diversas novas substâncias através da substituição de átomos de carbono por heteroátomos em sua estrutura. Ainda, esses compostos são capazes de desencadear as mais variadas respostas farmacológicas, o que inspira cada vez mais a síntese de novos híbridos e pesquisas por suas atividades (Mathur; Nain, 2014).

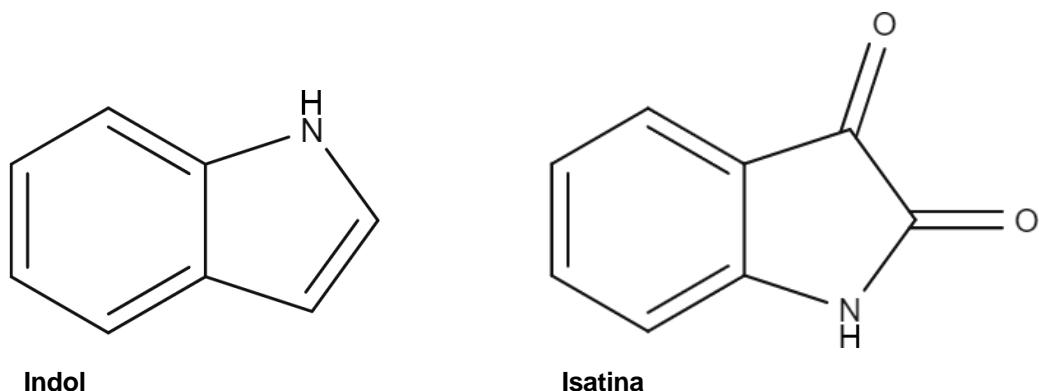
### **2.2 Isatina e seus derivados**

A isatina é um alcaloide natural que pode ser encontrado em diferentes organismos, como fungos, moluscos marinhos e em componentes da secreção da

glândula parótida de sapos da família Bufonidae. Nos seres humanos, é um metabólito endógeno originado da adrenalina, que está presente em vários tecidos e fluidos biológicos (Glover *et al.*, 1988; Varun *et al.*, 2019).

O esqueleto dessa molécula conta com o núcleo indol, que é uma estrutura heterocíclica de natureza aromática e bicíclica plana, no qual o anel benzeno se liga por meio das posições 2 e 3 ao anel pirrol, que contém nitrogênio (Figura 1). Ainda, esse núcleo é passível de sofrer reações de substituição, que são muito utilizadas por químicos para inserção de farmacóforos, visando o desenvolvimento de novas drogas sintéticas, com efeitos farmacológicos diversos (Melis *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Estruturas do núcleo indol e da isatina.



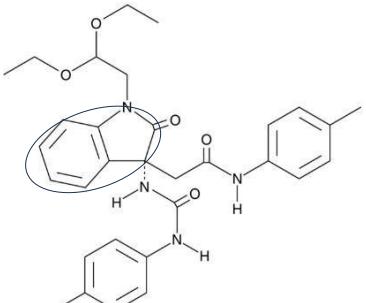
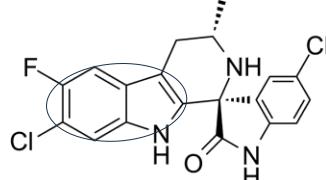
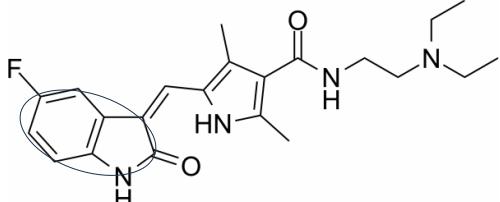
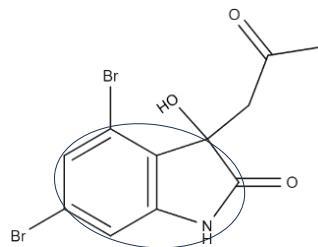
Fonte: adaptado de Lima-Junior *et al.*, 2016.

Esses compostos podem ser sintetizados a partir da reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH), por meio desta, cria-se um centro quiral, no qual permite a síntese de moléculas multifuncionais. Essa reação proporciona a formação de ligação química (carbono-carbono) entre átomos com mesma eletronegatividade. Por se tratar de uma reação de adição, a RMBH gera economia de átomos e somado a isso, a possibilidade do uso de água como solvente, reduzindo seu custo. Ainda, possui um curto período reacional e alto rendimento. (Pellissier, 2017; Xavier *et al.*, 2019).

A partir da isatina diversas moléculas vêm sendo sintetizadas. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que alguns de seus derivados (Figura 2) têm apresentado importantes atividades biológicas como: antitumoral, antioxidante, anticonvulsivante, anti-inflamatório, antimarial, entre outras (Ozgun *et al.*,

2016; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

**Figura 2.** Exemplos de derivados da Isatina com importância biológica.

Estrutura química	Nome	Indicação
	<b>AG-041</b>	Reparador de cartilagem
	<b>NITD609</b>	Antimalárico
	<b>SUNITINIB</b>	Antitumoral
	<b>CONVOLUTAMIDINA-A</b>	Anti-inflamatório

Fonte: adaptado de Burke *et al.*, 2022.

Levando em consideração a relevância da isatina e de seus derivados como promissores candidatos a novos fármacos, alguns estudos iniciais são necessários para cumprir a cadeia de produção de medicamentos, entre eles os testes de toxicidade. (Zhang *et al.*, 2020).

## **2.3 Toxicologia e modelos alternativos**

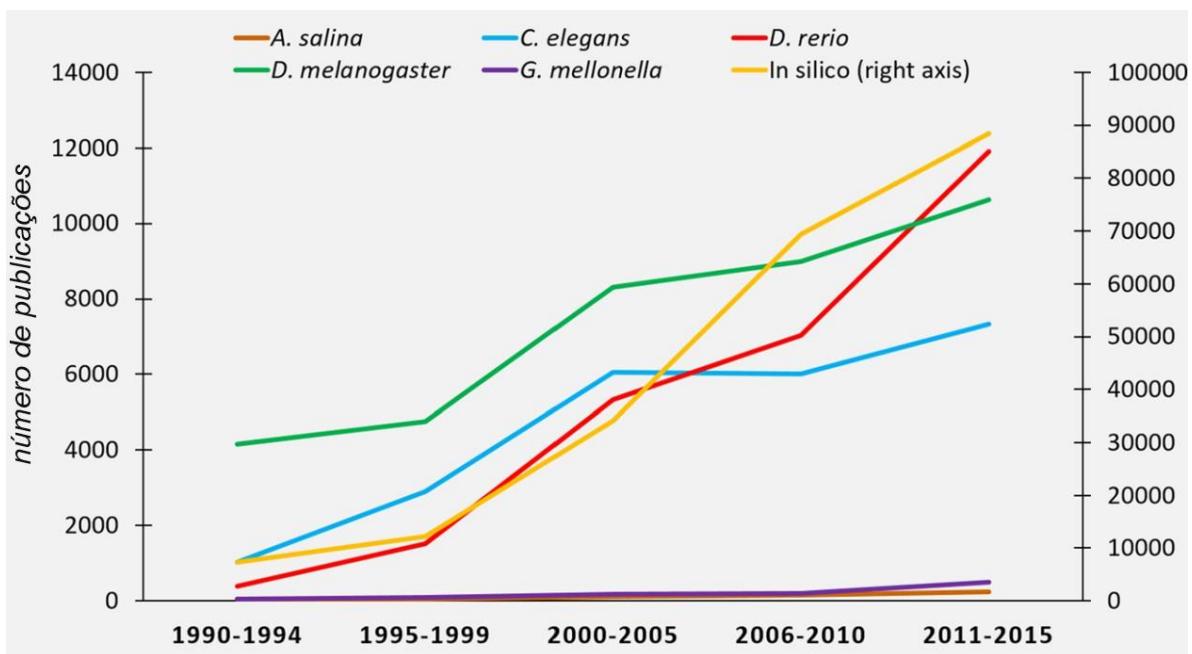
A realização de estudos não clínicos de toxicidade, para substâncias, é uma etapa crucial no desenvolvimento de novos medicamentos. Esses testes visam avaliar a segurança dos compostos antes que eles possam ser administrados em humanos, garantindo que potenciais tratamentos não causem danos significativos ao organismo. A toxicidade de uma substância pode se manifestar de várias formas, como efeitos adversos em órgãos vitais, reações alérgicas, ou mutagenicidade, que podem comprometer a saúde e a segurança dos pacientes (Ruszkiewicz *et al.*, 2018; Sandner *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o uso de animais, principalmente roedores, na pesquisa científica sempre foi necessário, uma vez que testes nesses organismos são importantes para entender como uma substância pode interagir com diferentes órgãos e sistemas num indivíduo vivo, além de revelar potenciais riscos de toxicidade. Modelos animais permitem observar interações farmacocinéticas, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção do composto, proporcionando uma visão mais clara de como o corpo humano pode reagir às substâncias (Knudsen *et al.*, 2019).

Ao mesmo tempo, a comunidade científica busca continuamente reduzir o uso de animais e adotar o princípio dos "3Rs" (Redução, Refinamento e Substituição), desenvolvendo métodos alternativos sempre que possível, com o objetivo de promover a ética na pesquisa sem comprometer a segurança dos medicamentos (Díaz *et al.*, 2020).

Freires e colaboradores, no ano de 2016, publicaram um estudo mostrando o aumento significativo do emprego de modelos alternativos nas pesquisas científicas (Figura 3), esse estudo revela que em um período de 25 anos ocorreu um aumento de 909% no uso desses modelos, sendo os principais *Drosophila melanogaster* (41,89%), *Danio rerio*, mais conhecido como zebrafish (29,74%) e *Caenorhabditis elegans* (26,53%). Entre esses, na área da toxicologia o nematoide *C. elegans* vem se destacando, por apresentar características apropriadas para tal finalidade (Leung *et al.*, 2008; Freires *et al.*, 2016).

**Figura 3.** Uso de modelos alternativos na pesquisa científica de 1990 a 2015.



Fonte: Freires et al., 2016.

## 2.4 *Caenorhabditis elegans*

A introdução do nematoide *Caenorhabditis elegans* à comunidade científica por Sydney Brenner, na década de 1960, estabeleceu esse organismo como um modelo experimental promissor para estudos biológicos. Brenner destacou vantagens do *C. elegans*, como seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto e o fato de possuir um sistema nervoso simples e bem definido (Romussi et al., 2024).

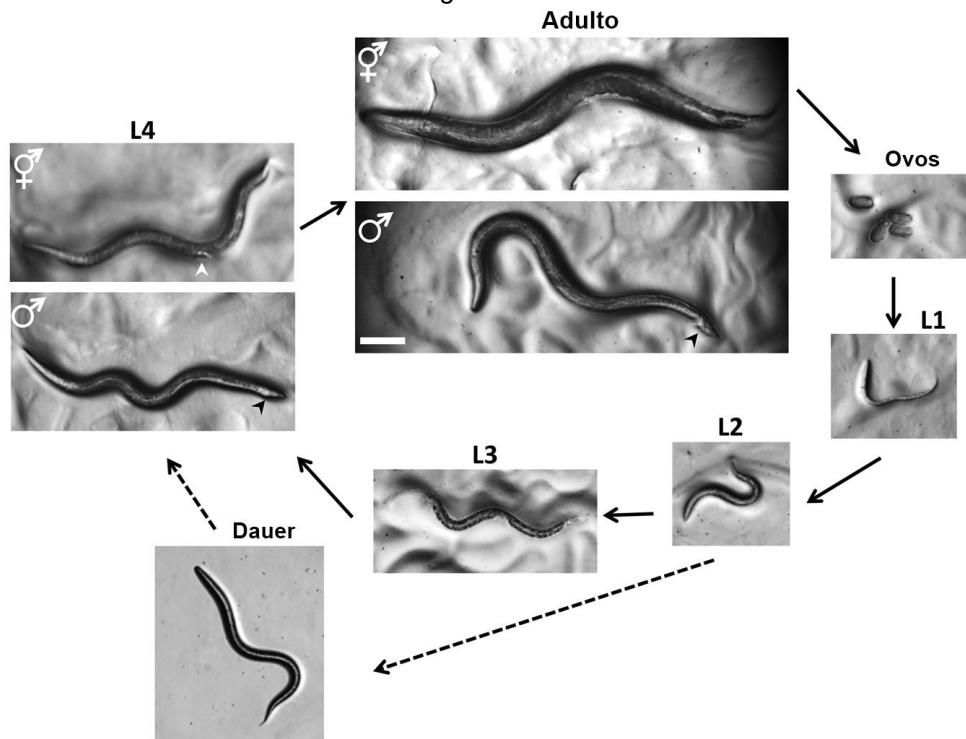
O *Caenorhabditis elegans* ou, comumente chamado, *C. elegans* é um pequeno nematoide de vida livre pertencente a ordem rhabditida, com distribuição global, habita ambientes úmidos e com temperaturas amenas. Na natureza essa espécie vive no solo ou em material vegetal em decomposição, os quais são locais favoráveis para obtenção da sua fonte de alimento, nesse caso microrganismos, em especial bactérias. Seu ciclo de vida é consideravelmente curto, quando em condições ideais de temperatura (20°C) desenvolve-se do ovo até a fase adulta em aproximadamente 3 dias. As larvas recém-eclodidas têm 0,25 milímetros de comprimento e os adultos chegam a 1 milímetro (Ruszkiewicz et al., 2018; Kuwahara et al., 2021).

Esses animais possuem duas formas sexuais: machos, que representam menos de 0,3% da população e hermafroditas, que são maioria. Ainda, os

nematoídeos hermafroditas são autofecundantes, a gônada destes forma um ovotestículo que num primeiro momento produz espermatozoides amebóides haplóides, sendo armazenados na espermateca no estágio L4 e, então, perto da idade adulta, a linhagem germinativa se altera e passa a produzir ovócitos. Quando ocorre a autofecundação são produzidos em média 300 embriões, já em situação de acasalamento com o macho esse número chega próximo dos 1000. (Lee TY et al., 2016; Carretero et al., 2017).

Uma vez ovoposto, o embrião leva em média 16 horas para eclosir e iniciar a fase larval, essa que por sua vez é dividida em 4 estágios: L1, L2, L3 e L4, durando aproximadamente 36 horas (Figura 4). Além disso, em condições de estresse o animal no estágio L2 pode se tornar uma larva Dauer, representando um estágio intermediário, de resistência, podendo suportar condições adversas por meses, retomando seu desenvolvimento após encontrar condições favoráveis novamente (Xiao-Ying et al., 2017).

**Figura 4.** Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*.



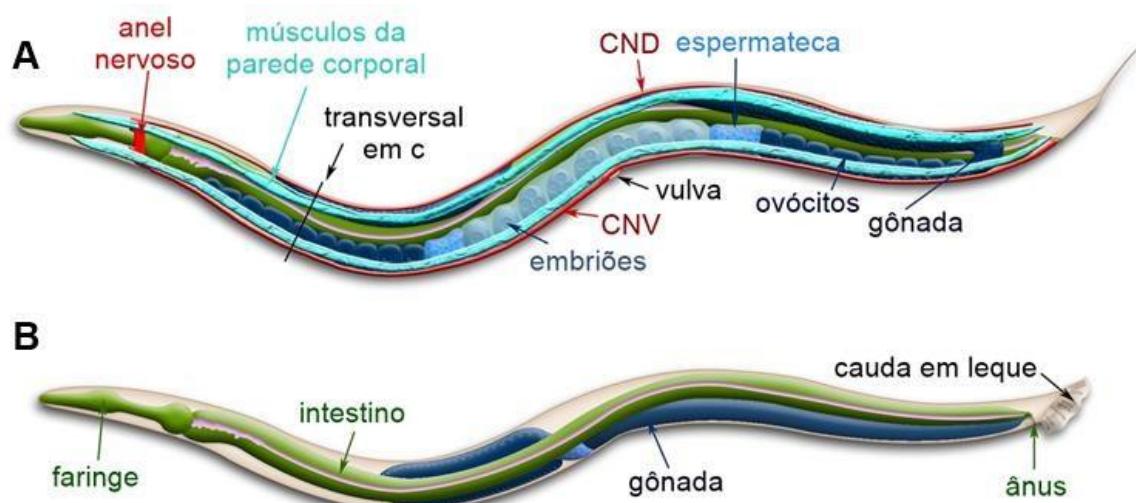
Fonte: WormBOOK, 2018.

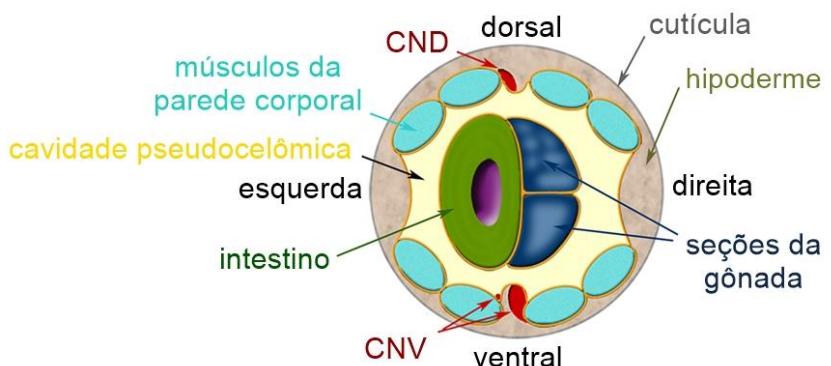
## 2.5 Morfologia de *Caenorhabditis elegans*

O *C. elegans* pertence ao filo Nematoda, que inclui vermes de corpo cilíndrico, com extremidades afiladas ou em forma de fio, cobertos por uma cutícula acelular com estriações transversais. Esses organismos possuem sistema digestório completo, um sistema excretor simples formado por canais longitudinais que se conectam ao poro excretor na região do esôfago, e um sistema nervoso parcialmente centralizado com um anel nervoso ao redor do esôfago. Eles não possuem sistemas circulatório e respiratório (Roberts-Janovy *et al.*, 2009; Kudelsk *et al.*, 2017).

Uma característica notável do *C. elegans* é que, apesar de sua simplicidade, ele possui tecidos bem definidos. Logo abaixo da cutícula (Figura 5), a camada mais externa de células chamada tradicionalmente de hipoderme, envolve uma cavidade cheia de fluido pseudocelômico, onde se encontram os principais sistemas de órgãos. Imediatamente abaixo desta, encontram-se as faixas musculares, que são responsáveis pelo movimento do organismo, assim como os cordões nervosos ventral e dorsal que inervam esses músculos. Dentro dessa região neuromuscular estão os sistemas digestivo, excretor e reprodutivo (Corsi *et al.*, 2015; Steele *et al.*, 2018).

**Figura 5.** Anatomia de *Caenorhabditis elegans*.



**C**

Fonte: adaptado de WormBOOK, 2018.

A camada mais externa do verme é a sua cutícula, uma matriz extracelular consistente, constituída predominantemente de colágeno, lipídios e glicoproteínas. Tem extrema importância para proteção do animal, evitando o contato direto de estruturas vitais com o ambiente, ainda, a cutícula da larva dauer envolve completamente o animal e tampa a sua boca, impedindo que o verme se alimente, interrompendo o seu desenvolvimento. A cutícula dauer tem maior resistência a produtos químicos, por isso fornece maior proteção contra estresses ambientais e agentes cáusticos (Page *et al.*, 2007).

Logo abaixo da epiderme, encontram-se quatro quadrantes de músculos da parede corporal, que se estendem ao longo do corpo (Figura 5C). A contração e o relaxamento rítmicos dessas células musculares geram o movimento "elegante" e ondulatório do animal. Além dos músculos da parede corporal, o *C. elegans* possui músculos responsáveis por controlar a alimentação (músculos faríngeos), a postura de ovos (músculos vulvares e uterinos) e a defecação (músculos entéricos) (Brassinga *et al.*, 2019).

O sistema digestório de *C. elegans* é composto principalmente pela boca, faringe, intestino e ânus. O intestino é um dos principais órgãos, representando cerca de um terço da massa total do animal. É composto por uma camada única de células epiteliais que formam um tubo ao longo do corpo do animal, e é responsável pela digestão e armazenamento de nutrientes. O sistema excretor, por outro lado, é simples e consiste em uma célula excretora em forma de H, que se estende ao longo do corpo e está conectada a ductos que excretam resíduos metabólicos e excessos de água através de um poro excretor localizado na parte anterior do animal. Histologicamente, o intestino é composto por células epiteliais com

microvilosidades que aumentam a superfície de absorção, enquanto o sistema excretor é constituído por células tubulares especializadas que regulam o equilíbrio osmótico e a excreção de resíduos (Bratanich *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017).

O sistema reprodutor de *C. elegans* é composto por estruturas distintas nos hermafroditas e nos machos. Nos hermafroditas, o sistema inclui duas gônadas em forma de U, ovidutos, uma espermateca para armazenamento de espermatozoides e um útero onde os ovos fertilizados se desenvolvem antes de serem postos. Nos machos, o sistema reprodutor consiste em uma única gônada, que produz e armazena espermatozoides, conectando-se a uma vesícula seminal, um ducto deferente e um órgão copulador especializado (Brassinga *et al.*, 2019).

O sistema nervoso de *C. elegans* é relativamente simples, mas altamente organizado, consistindo em 302 neurônios em hermafroditas e 385 neurônios em machos. Esses neurônios estão distribuídos em várias regiões, com a maioria concentrada em torno da cabeça e da cauda, formando estruturas como o anel nervoso (a principal massa de nervos) e gânglios caudais. Histologicamente, esse sistema nervoso é composto por neurônios sensoriais, motores e interneurônios, que são responsáveis por processar informações sensoriais e coordenar movimentos e comportamentos. As células nervosas estão envoltas por células gliais que, embora poucas, desempenham funções de suporte, incluindo a formação de barreiras para proteção dos neurônios e a regulação do ambiente extracelular (Shaham *et al.*, 2015; Wani *et al.*, 2020).

## 2.6 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

*C. elegans* é usado atualmente para estudar muitos processos biológicos, como a apoptose, sinalização celular, ciclo celular, regulação gênica, metabolismo e envelhecimento. O conhecimento aprofundado sobre o organismo é um ponto importante para elucidação de achados em estudos com sua aplicação. No ano de 2002, Sydney Brenner e Jhon Sulston ganharam o prêmio Nobel de fisiologia e medicina após importantes descobertas sobre a regulação gênica do desenvolvimento de órgãos e morte celular programada, tendo grande contribuição em estudos que impactaram na saúde humana (WormBOOK, 2018).

Um ponto crucial da utilização de *C. elegans* como modelo experimental é a facilidade de cultivo e o baixo custo de manutenção. Esses organismos podem ser

mantidos em pequenos espaços, com grande número de indivíduos, exigindo recursos mínimos, além de possuir uma dieta baseada apenas em *Escherichia coli*. Isso torna sua utilização altamente viável em experimentos de larga escala, sem a necessidade de grandes investimentos, quando em comparação com modelos animais tradicionais, como roedores. (Iliff *et al.*, 2020).

O ciclo de vida curto de *C. elegans* também é uma grande vantagem para os estudos, uma vez que esse animal se desenvolve de ovo a verme adulto em aproximadamente três dias, e cada adulto gera de 300 a 1000 descendentes, o que facilita a sua produção e experimentação em grande quantidade e torna possível a realização de experimentos, como estudos de senescência, que seriam impraticáveis em organismos com ciclos de vida mais longos (Kipreos *et al.*, 2019). A transparência do seu corpo oferece outra vantagem única. Como o nematódeo é transparente, é possível acompanhar em tempo real processos biológicos como alterações morfológicas, crescimento e embriogênese, por meio de microscopia, sem a necessidade de técnicas invasivas ou uso de corantes específicos. Isso permite o estudo detalhado de processos que são, muitas vezes, difíceis de observar em outros organismos (WormBOOK, 2018).

Ainda, trata-se de um animal invertebrado, então para utilização do mesmo em estudos não é necessária que o trabalho receba aprovação do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA) nem do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), reduzindo tempo e burocracia para início de pesquisas (Riddell *et al.*, 1997).

Especificamente para estudos em toxicologia, *Caenorhabditis elegans* é um modelo valioso, pois compartilha muitos processos fisiológicos e respostas ao estresse conservados em organismos mais complexos. Adicionalmente, este nematoide possibilita a detecção de alterações fisiológicas em fatores a nível de organismo como alimentação, reprodução, expectativa de vida e locomoção, fatores esses que podem ser alterados por toxicidade de substâncias. (Ruszkiewicz *et al.*, 2018).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar a toxicidade *in vivo* do derivado da isatina 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) em modelo de *Caenorhabditis elegans*, por meio da análise de parâmetros fisiológicos do animal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a taxa de eclosão de ovos de *Caenorhabditis elegans* tratados com diferentes concentrações de ISACN em comparação com seu respectivo grupo controle.
- Avaliar o padrão de locomoção de *Caenorhabditis elegans* submetidos a tratamento com diferentes concentrações de ISACN em comparação com seu respectivo grupo controle.
- Quantificar os batimentos faríngeos, por intervalo de tempo, de *Caenorhabditis elegans* tratados com diferentes concentrações de ISACN, em comparação com seu respectivo grupo controle.
- Mensurar o desenvolvimento corporal de *Caenorhabditis elegans* tratados com diferentes concentrações de ISACN, em comparação com seu respectivo grupo controle.
- Analisar possíveis alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* decorrentes do tratamento com diferentes concentrações de ISACN em comparação com seu respectivo grupo controle e achados da literatura.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

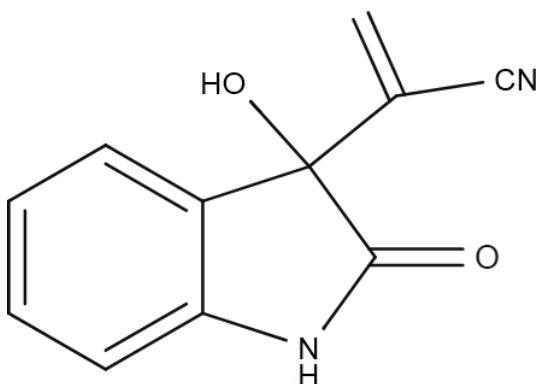
### 4.1 Locais de pesquisa

O projeto de pesquisa foi realizado nas dependências do Laboratório de Ensaios Toxicológicos da UFPB (LABETOX), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM-UFPB).

### 4.2 Substância teste

O derivado da isatina 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) (Figura 6) foi sintetizado e cedido pelo Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), coordenado pelos professores Dr. Claudio Gabriel Lima Junior e Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba, em colaboração.

**Figura 6.** Estrutura do derivado ISACN.



Fonte: Lima-Junior *et al.*, 2016.

Objetivando a realização de estudos de toxicidade *in vitro*, com a mesma substância teste, para comparativos futuros entre os resultados de diferentes modelos experimentais, as concentrações de isatina definidas para utilização nos grupos de tratamento foram 3, 30 e 300 µg/ml, concentração essa que é 100x maior que a utilizada em modelo celular.

A substância foi preparada e armazenada em soluções estoque, utilizando-se água e DMSO a 1% como solvente. Sendo diluídas nas concentrações

desejadas, antes de cada experimento, em meio LB (Luria Bertani) líquido.

#### **4.3 Obtenção e manutenção de *Caenorhabditis elegans***

Para realização do trabalho a cepa de *C. elegans* utilizada foi a N2 (selvagem) fornecidas pelo Laboratório de Genética Bioquímica (LGB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em parceria.

Os animais foram cultivados em placas de petri com meio de cultura sólido para crescimento de nematoídes NGM (nematode growth medium) composto por NaCl; peptona; ágar bacteriológico; água; colesterol; CaCl<sub>2</sub>; MgSO<sub>4</sub> e tampão KPO<sub>4</sub>. Acima do meio, era adicionado uma fina camada de *Escherichia coli* (cepa OP50) como fonte de alimento, em quantidade suficiente para revestir uniformemente a superfície da placa.

As placas de manutenção foram mantidas à temperatura controlada de 20°C em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) e semanalmente passaram pelo processo de repique, em que os vermes eram transferidos para novas placas, garantindo o suprimento alimentar e qualidade da cepa.

#### **4.4 Cultivo de *Escherichia coli***

A bactéria *Escherichia coli* (OP50) foi utilizada como fonte de alimento para o *C. elegans*. Esses microrganismos eram mantidos em placas de petri com meio LB (Luria Bertani) sólido, de composição: triptona; extrato de levedura; NaCl; ágar e água.

A manutenção das placas de bactérias é semelhante as de *C. elegans*, passando por repique semanal para garantir a qualidade das colônias. Já para utilização da *E. coli* em placas de manutenção e experimento, as bactérias eram suspensas em meio LB líquido e posteriormente distribuídas uniformemente nas placas.

#### **4.5 Sincronização cronológica de *Caenorhabditis elegans***

Na realização de experimentos é importante garantir que todos os animais dos grupos experimentais estejam no mesmo estágio larval, em idade igual. Para

isso, é realizada a sincronização cronológica dos vermes.

Primeiramente, a placa de cultivo contendo adultos grávidos é lavada com solução tampão M9, que arrasta os vermes da placa, então esse líquido é transferido para um tubo falcon estéril e após sedimentação espontânea o sobrenadante é desprezado, em seguida mais M9 é inserido no tubo. Esse procedimento é repetido por 3 vezes, objetivando a retirada das bactérias que estão presentes no meio, resultando em uma suspensão contendo apenas *C. elegans* e tampão M9.

Após essa lavagem, o sobrenadante é desprezado e adiciona-se ao tubo 1 ml da solução de lise alcalina (1 ml NaOH 10M + 4 ml hipoclorito de sódio a 2% + 5 ml de água), a qual rompe a cutícula dos vermes, permitindo que os ovos sejam liberados no meio. Logo após a solução de lise ser colocada no tubo, o mesmo é levado ao vórtex para acelerar o processo de rompimento da cutícula.

Assim que todos os vermes sofrem lise, o tubo é levado à centrífuga novamente e lavado com tampão M9 por mais 3x, dessa vez para garantir que não fiquem resquícios de solução de lise no meio.

Os ovos resistentes ao tratamento são coletados e colocados em microtubos contendo tampão M9 por um período de 12 horas em constante movimento, no homogeneizador. Ainda, são mantidos na ausência de alimento a fim que os embriões eclosos se mantenham em estágio L1.

#### **4.6 Ensaio de eclosão de ovos**

Para avaliar se o derivado da isatina era capaz de causar toxicidade aos ovos de *C. elegans* foi aplicado o protocolo de taxa de eclosão de ovos. (Sant'anna et al., 2013). Assim, os embriões resistentes ao processo de lise alcalina (explicado em 4.5) foram coletados e semeados em placas com NGM, contendo em sua superfície diferentes concentrações da substância, que foram diluídas na suspensão de LB líquido e *E. coli* (OP50).

Assim, os ovos foram separados em 5 grupos experimentais, sendo eles: 1 grupo controle (apenas OP50); 3 grupos tratados (OP50 + ISACN 3, 30 e 300 µg/ml) e 1 grupo DMSO (OP50 + DMSO 0,1%), todas as condições foram realizadas em triplicata, totalizando 15 placas de experimento.

Em cada placa foi adicionada a suspensão contendo embriões de *C.*

*elegans*, em volume suficiente para abarcar uma quantidade média de 30 ovos por grupo, que posteriormente eram conferidos para evitar quantidades discrepantes. Então, as placas foram incubadas em 20ºC por 24 horas.

Após esse período de tempo foi realizada a leitura, que consistiu na contagem da quantidade de vermes se movendo na placa e/ou ovos não eclodidos. Para essa avaliação foram realizados três experimentos em triplicata, totalizando 45 grupos experimentais.

#### **4.7 Ensaio de motilidade**

Para análise de possíveis alterações motoras causadas pelo derivado da isatina em *C. elegans*, foi realizado o ensaio de curvatura corporal, de acordo com protocolos descritos por Anne C. Hart. para experimentos comportamentais com a espécie (WormBook, 2006). Assim, 24 horas após o procedimento de lise alcalina, os vermes em estágio L1 foram distribuídos em placas com NGM, incubadas com diferentes concentrações de ISACN.

Então, as larvas foram separadas em 5 grupos experimentais, sendo eles: 1 grupo controle (apenas OP50); 3 grupos tratados (OP50 + ISACN 3, 30 e 300 µg/ml) e 1 grupo DMSO (OP50 + DMSO 0,1%), todas as condições foram realizadas em triplicata, totalizando 15 placas de experimento.

Em cada placa foi adicionada a suspensão contendo vermes no estágio L1, em volume suficiente para abarcar uma quantidade média de 50 indivíduos por grupo, que posteriormente eram conferidos para evitar quantidades discrepantes. Então, as placas foram incubadas em 20ºC por 48 horas.

Após o período de tempo necessário para os vermes se encontrarem na fase adulta, foi realizada a leitura. Os animais foram transferidos para placas com NGM sem bactéria cerca de 3 minutos antes da análise em lupa estereoscópica. A contagem foi obtida através da observação dos movimentos corporais dos vermes em um intervalo de 20 segundos.

Cada vez que o animal realiza um movimento completo movimentando o seu corpo de um lado para o outro, em “zig zag”, é contabilizada uma curvatura corporal, o número obtido nesse intervalo de 20 segundos pode ser multiplicado por três para se obter uma média de curvaturas por minuto. Para essa avaliação foram realizados

três experimentos em triplicata, utilizando 10 vermes por grupo em um total de 45 grupos experimentais.

#### **4.8 Ensaio de quantificação de batimentos faríngeos**

Para avaliação de possíveis alterações no ritmo de batimentos faríngeos causadas pela isatina em *C. elegans*, foi realizado o ensaio de quantificação dos batimentos faríngeos, seguindo o protocolo descrito por Raizen e colaboradores (WormBook, 2012). Assim, 24 horas após o procedimento de lise alcalina (explicado em 4.5), os vermes em estágio L1 foram distribuídos em placas com NGM, incubadas com diferentes concentrações de ISACN.

Então, as larvas foram separadas em 5 grupos experimentais, sendo eles: 1 grupo controle (apenas OP50); 3 grupos tratados (OP50 + ISACN 3, 30 e 300 µg/ml) e 1 grupo DMSO (OP50 + DMSO 0,1%), todas as condições foram realizadas em triplicata, totalizando 15 placas de experimento.

Em cada placa foi adicionada a suspensão contendo vermes no estágio L1, em volume suficiente para abranger uma quantidade média de 50 indivíduos por grupo, que posteriormente eram conferidos para evitar quantidades discrepantes. Então, as placas foram incubadas em 20ºC por 48 horas.

Após o período de tempo necessário para os vermes se encontrarem na fase adulta, foi realizada a leitura. Os animais foram transferidos para placas com NGM sem bactéria cerca de 3 minutos antes da análise em microscópio (aumento de 40x). A contagem foi feita através da observação dos movimentos de pulsação do bulbo terminal da faringe dos animais em um intervalo de 20 segundos. O número obtido nesse intervalo de tempo pode ser multiplicado por três para se obter uma média de curvaturas por minuto. Para essa avaliação foram realizados três experimentos em triplicata, utilizando 10 vermes por grupo em um total de 45 grupos experimentais.

#### **4.9 Ensaio de desenvolvimento corporal**

Para avaliar se o derivado da isatina é capaz de influenciar o desenvolvimento de *C. elegans*, foi realizado o ensaio de crescimento corporal.

(Anne C. Hart, 2006). De forma semelhante às outras metodologias, 24 horas após o procedimento de lise alcalina (explicado em 4.5), os vermes em estágio L1 foram distribuídos em placas com NGM, incubadas com diferentes concentrações de ISACN.

Então, as larvas foram separadas em 5 grupos experimentais, sendo eles: 1 grupo controle (apenas OP50); 3 grupos tratados (OP50 + ISACN 3, 30 e 300 µg/ml) e 1 grupo DMSO (OP50 + DMSO 0,1%), todas as condições foram realizadas em triplicata, totalizando 15 placas de experimento.

Em cada placa foi adicionada a suspensão contendo vermes no estágio L1, em volume suficiente para abranger uma quantidade média de 30 indivíduos por grupo. Então, as placas foram incubadas em 20ºC por 48 horas para que os animais atingissem o estágio adulto.

Passado esse período de tempo, realizou-se a leitura do experimento. As placas com os animais foram lavadas com tampão M9, para retirada de bactérias do meio, em seguida os animais foram capturados e transferidos para lâminas histológicas, sendo posteriormente analisados ao microscópio (aumento de 10x). Ainda, com auxílio do software ImageView foram capturadas imagens individuais dos vermes, que depois passaram por análise no ImageJ, tendo seu comprimento mensurado. Para essa avaliação foram realizados três experimentos em triplicata, utilizando 10 vermes por grupo em um total de 45 grupos experimentais.

#### **4.10 Ensaio de análise de morfologia**

Com o objetivo de avaliar se o derivado ISACN pode causar alguma alteração estrutural em *C. elegans*, foi realizado o ensaio de análise morfológica. Após 24 horas do procedimento de lise alcalina (explicado em 3.5), os vermes em estágio L1 foram distribuídos em placas com NGM, incubadas com diferentes concentrações de ISACN (Mayer *et al.*, 2014; Palermo, 2021)

Então, as larvas foram separadas em 5 grupos experimentais, sendo eles: 1 grupo controle (apenas OP50); 3 grupos tratados (OP50 + ISACN 3, 30 e 300 µg/ml) e 1 grupo DMSO (OP50 + DMSO 0,1%), todas as condições foram realizadas em triplicata, totalizando 15 placas de experimento.

Em cada placa foi adicionada a suspensão contendo vermes no estágio L1,

em volume suficiente para abranger uma quantidade média de 30 indivíduos por grupo. Então, as placas foram incubadas em 20°C por 48 horas para que os animais atingissem o estágio adulto.

Após 48 horas, os vermes submetidos ao experimento foram transferidos de suas placas para lâminas de vidro e visualizados sob microscopia óptica. Após análise, imagens dos animais foram capturadas utilizando o software ImageView e, posteriormente, comparadas entre os grupos experimentais buscando alterações estruturais nos animais. Para essa avaliação foram realizados três experimentos em triplicata, utilizando 10 vermes por grupo em um total de 45 grupos experimentais

#### **4.11 Análises estatísticas**

Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o software Graphpad Prism versão 9.0, sendo também utilizado para a construção dos gráficos. Todos os resultados estão expressos em média  $\pm$  e.p.m (erro padrão da média) de três experimentos realizados em triplicata. Esses dados foram processados por análise de variância (ANOVA) one-way seguido de pós teste de Tukey. Foram considerados resultados significativos quando apresentarem valores de  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os estudos de toxicidade não clínica têm a finalidade de identificar as características toxicológicas de determinada substância, sendo ela natural, semissintética ou sintética. Esses estudos são fundamentais em diversas áreas, incluindo farmacologia, química e biotecnologia, visando avaliar os efeitos adversos de compostos em organismos vivos. (Carvalho *et al.*, 2009; Stagg *et al.*, 2020).

Assim, o presente trabalho avaliou a toxicidade *in vivo* de um derivado da isatina (ISACN) em modelo experimental de *Caenorhabditis elegans*, por meio das metodologias descritas em materiais e métodos. Após realização dos experimentos e análise estatística dos dados, foram obtidos os seguintes resultados:

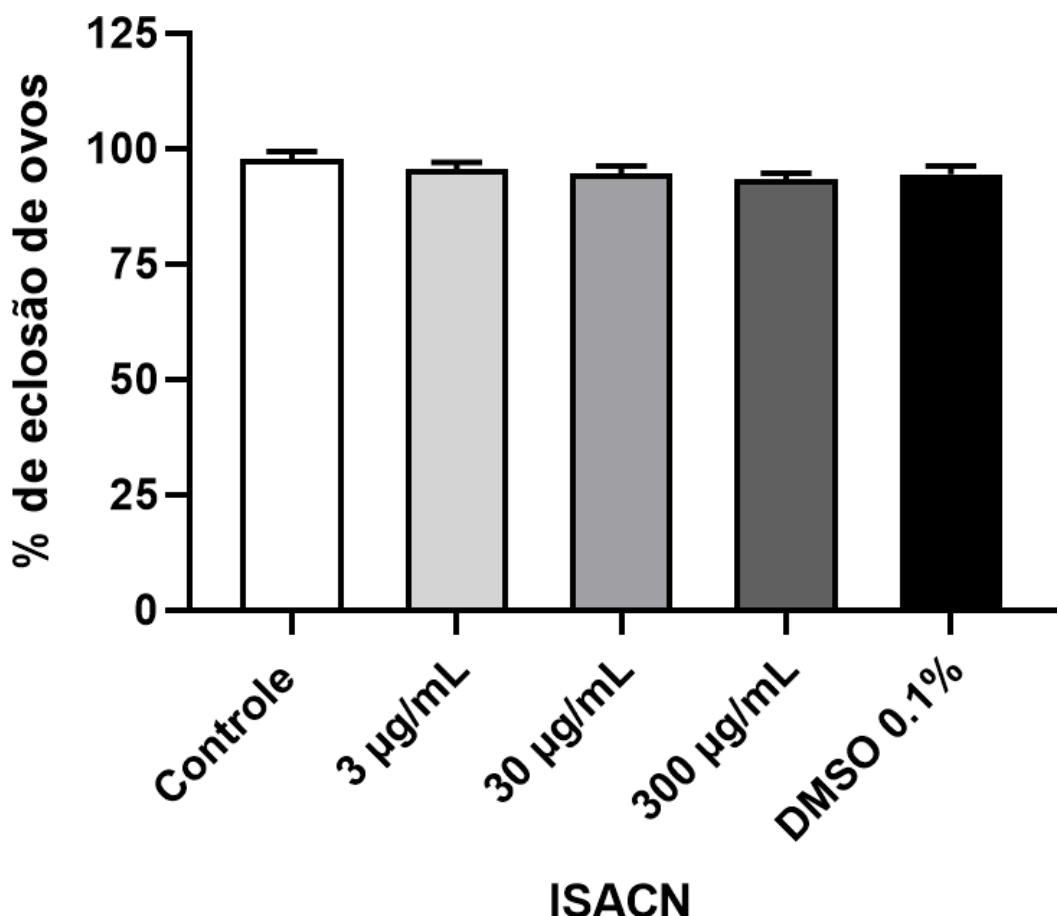
### **5.1 Ensaio de eclosão de ovos**

A metodologia de avaliação da eclosão de ovos de *Caenorhabditis elegans* é uma ferramenta valiosa para avaliar a atividade toxicológica de compostos químicos, frente à espécie, devido a sua simplicidade, reproduzibilidade e relevância biológica. Esta abordagem permite a análise dos efeitos de substâncias sobre o desenvolvimento embrionário do nematoide, fornecendo informações sobre como essas substâncias afetam o desenvolvimento e a sobrevivência das larvas (Hernando *et al.*, 2024).

O ovo de *Caenorhabditis elegans* é relativamente simples, com casca e massa embrionária no interior, porém sua estrutura é eficaz na tarefa de proteger o embrião em desenvolvimento. A casca do ovo é trilaminar, sendo a camada vitelina a mais externa, seguida pela intermediária de quitina e uma camada interna de condroitina proteoglicana (CPG). Ainda, membranas e espaços separam a casca do embrião propriamente dito (Hunt *et al.*, 2018).

Essas camadas funcionam como barreiras de proteção ao ambiente, evitando que substâncias possivelmente nocivas prejudiquem o desenvolvimento do ovo. Essa metodologia vem sendo bastante aplicada em *C. elegans* para testes objetivando a busca de novas substâncias com potencial antimicrobiano, em decorrência do surgimento de resistência a antiparasitários (Zain *et al.*, 2016; Hahnel *et al.*, 2020).

**Figura 7:** Percentual de ovos de *Caenorhabditis elegans* ecloididos após 24 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.



Não houve diferenças significativas,  $p>0,05$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

No ensaio de eclosão de ovos, nenhuma das concentrações testadas de ISACN induziu toxicidade significativa à progênie de *C. elegans*. Logo, como observado no gráfico da figura 7, quando comparados ao grupo controle, não foram encontradas grandes alterações de viabilidade nos grupos tratados. Indicando que, nas concentrações avaliadas, esse derivado da isatina apresentou baixa toxicidade aos embriões, não influenciando a eclosão dos ovos.

Harlow e colaboradores, em 2016, avaliaram se ensaios com *C. elegans* poderiam prever atividade citotóxica ou níveis de toxicidade embrionária no desenvolvimento de mamíferos, assim optaram por realizar o ensaio de eclosão de ovos testando diversos alcalóides fungicidas, entre esses, alguns demonstraram causar teratogenicidade em ratos. Após os ensaios, tal como nos mamíferos, esses compostos induziram toxicidade no desenvolvimento embrionário de *C. elegans*,

enquanto os que não foram tóxicos aos roedores também demonstraram ação semelhante nos ovos, obtendo resultados coerentes entre os 2 modelos experimentais e assim concluindo que o ensaio de eclosão de ovos de *C. elegans* pode ser um preditor para indicar toxicidade embrionária.

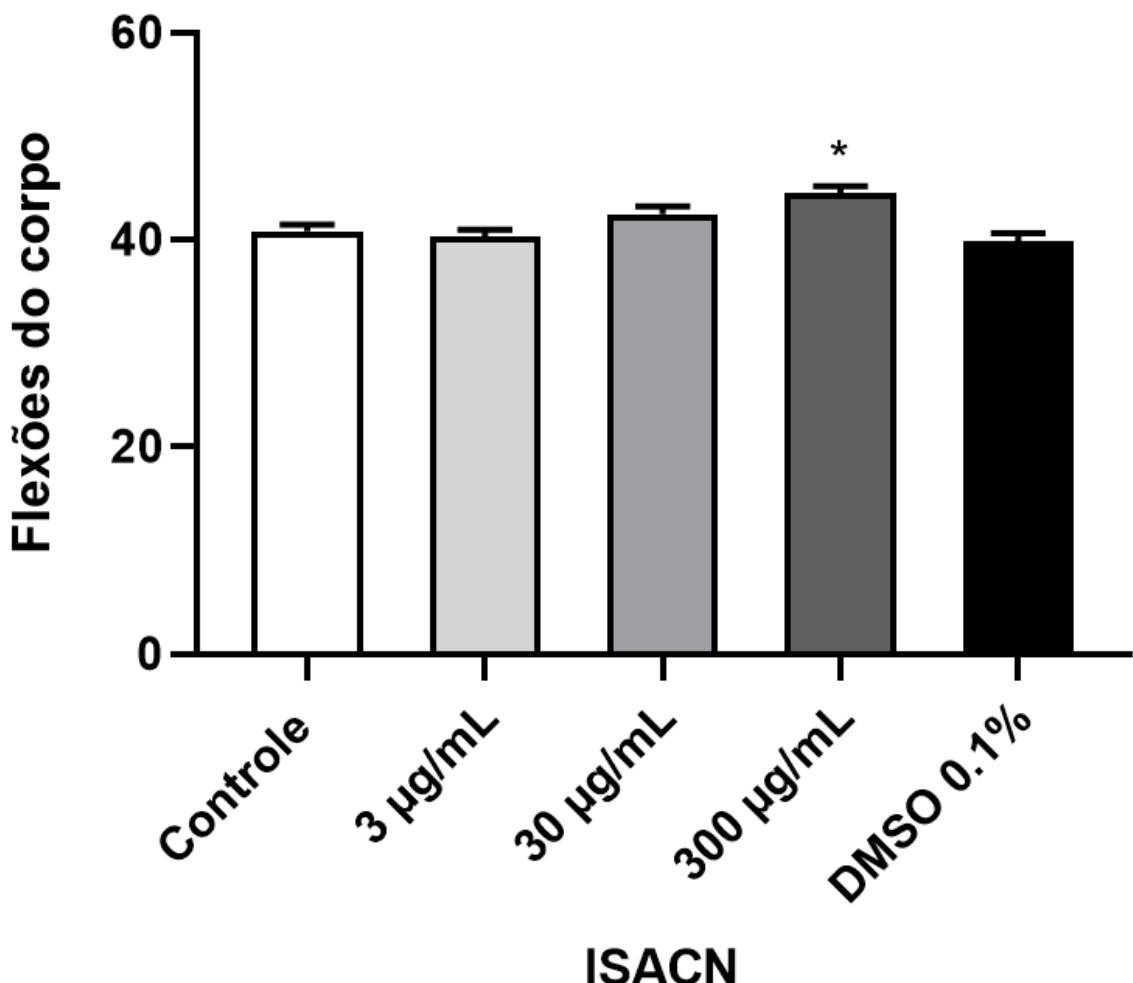
## 5.2 Ensaio de motilidade

A taxa de motilidade de um animal é um parâmetro crucial para avaliar seu estado de saúde e normalidade fisiológica. Nesse sentido, mudanças no comportamento motor dos nematoides após tratamento com substâncias podem estar associadas diretamente com alterações no seu sistema nervoso (Petratou *et al.*, 2023).

A avaliação de movimento para esses animais incluem: taxa média de movimento, agitação da cabeça, flexão do corpo e agitação para frente e para trás, entre os quais as frequências de agitação da cabeça e flexão do corpo são os parâmetros mais comuns. Em pesquisas com *C. elegans*, a frequência das flexões corporais é comumente utilizada, permitindo investigar efeitos de fármacos, substâncias químicas ou mutações que podem afetar o comportamento do verme e os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, relacionados (Han-GC *et al.*, 2022).

Esse animal é capaz de se locomover de diferentes formas, podendo nadar na água ou/e se arrastar na terra. Tais comportamentos são dirigidos por distintos circuitos neurais e para manter uma frequência normal de movimentos, a serotonina, que é o principal neurotransmissor relacionado à ação, deve estar em correto funcionamento (Vidal-Gadea *et al.*, 2012).

**Figura 8:** Quantificação de flexões corporais de *Caenorhabditis elegans* após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.



\* indica diferenças significativas entre as condições;  $p < 0,05$   
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

No gráfico da figura 8, observa-se um aumento na quantificação de flexões corporais de *C. elegans* na maior concentração testada. Os resultados foram significativos em relação ao grupo controle, indicando que o derivado ISACN possa induzir toxicidade ao nematoide na concentração de 300 µg/mL.

O tratamento com substâncias químicas pode aumentar a taxa de mobilidade de *Caenorhabditis elegans* através de vários mecanismos, envolvendo a interação dessas moléculas com os sistemas neuromusculares e de sinalização do organismo (Land *et al.*, 2021).

Uma hipótese para tal achado é a alteração dos níveis de

neurotransmissores, em especial a serotonina, uma vez que as substâncias podem influenciar na liberação, recaptação e degradação dessas moléculas. Ademais, alguns compostos químicos são capazes de modificar como os circuitos neurais são ativados, ou ainda causar estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio, que influenciam a coordenação entre diferentes músculos e neurônios motores. Podendo culminar em padrões de locomoção mais rápidos ou mais frequentes (Kim et al., 2015).

Além da serotonina, outro neurotransmissor importante para o movimento de *C. elegans* é a acetilcolina. Estudos de Salim e colaboradores (2024) relataram como a nicotina, que também é um alcaloide, pode alterar o padrão de movimentação do nematoide, sendo capaz de aumentar o ritmo de locomoção do mesmo.

Portanto, a taxa de flexões aumentada em *C. elegans* quando submetido ao tratamento com ISACN na concentração de 300 µg/mL pode ser resultado de diferentes alterações no organismo do animal, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre mecanismo de toxicidade da substância no modelo experimental de *Caenorhabditis elegans* para elucidação do achado.

### **5.3 Ensaio de quantificação de batimentos faríngeos**

A nutrição do *Caenorhabditis elegans* depende da ação da faringe, que é uma estrutura neuromuscular responsável por capturar os alimentos e os transportar da boca até o intestino do animal. Isso ocorre através de dois tipos de movimentos: o bombeamento e o peristaltismo do istmo (Bonnard et al., 2022)

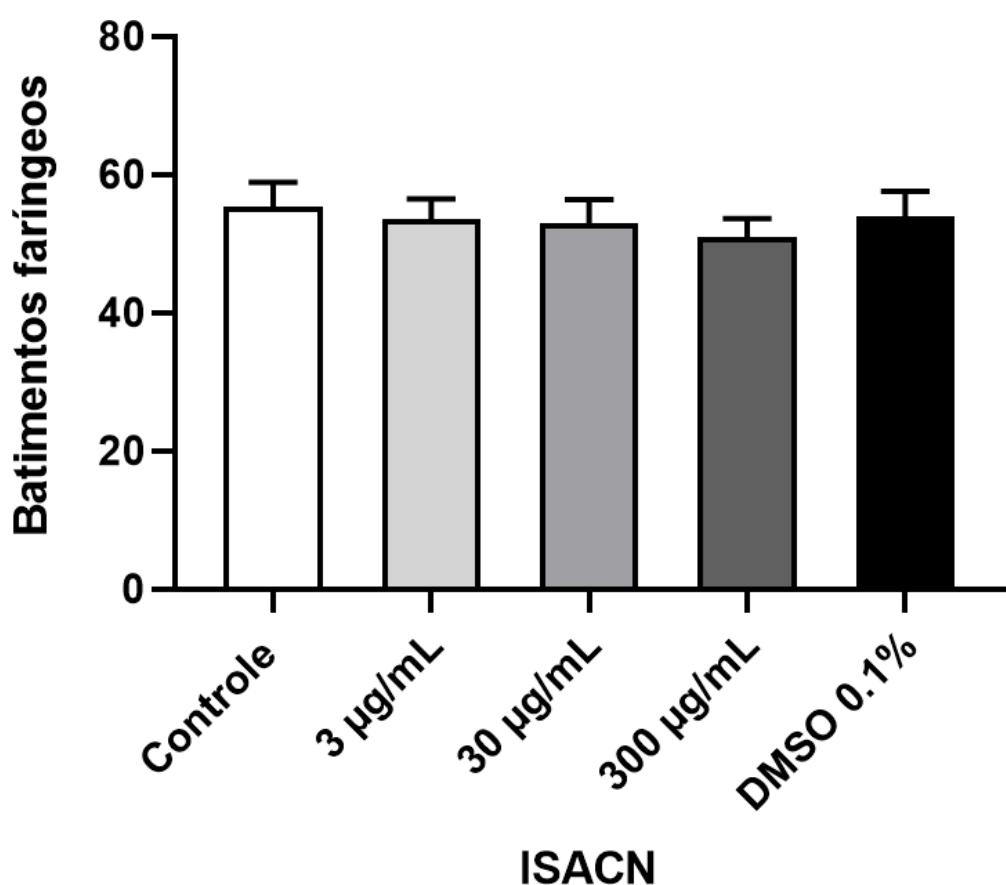
O bombeamento faríngeo, que é o mais visível e melhor compreendido, consiste em um ciclo de contração e relaxamento que suga o líquido do ambiente ao redor, juntamente com partículas suspensas, e depois expulsa o líquido, retendo apenas as partículas (Raizen et al., 2012).

Essa ação é controlada por neurônios motores (MC e M3): MC controla quando uma contração começa e M3 quando ela termina. Cada ciclo de contração/relaxamento corresponde a um único potencial de ação do músculo faríngeo, os principais componentes intracelulares responsáveis por esse ciclo são os receptores nicotínicos de acetilcolina ativados por MC e os canais de cloreto

dependentes de glutamato ativados por M3 (Avery *et al.*, 2003)

A quantificação dos batimentos faríngeos fornece parâmetros importantes, como a alimentação do animal, tendo em vista que essa é uma condição essencial para o desenvolvimento do mesmo. Consequentemente, indica o funcionamento dos neurotransmissores (acetilcolina, serotonina e glutamato) e grupos musculares que estão relacionados ao processo (Ishita *et al.*, 2020).

**Figura 9:** Batimentos faríngeos de *Caenorhabditis elegans* após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.



Não houve diferenças significativas,  $p>0,05$   
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

De acordo com os resultados obtidos no gráfico da figura 9, observa-se que ISACN não causou alterações significativas, no padrão de batimentos faríngeos dos animais, em nenhuma das concentrações testadas. Ainda, Trojanowski e colaboradores (2015) mostraram que a cepa selvagem N2-Bristol apresenta cerca de 50-60 batimentos faríngeos a cada 20 segundos, quando em condições experimentalmente controladas. No atual estudo, foram encontrados resultados

semelhantes.

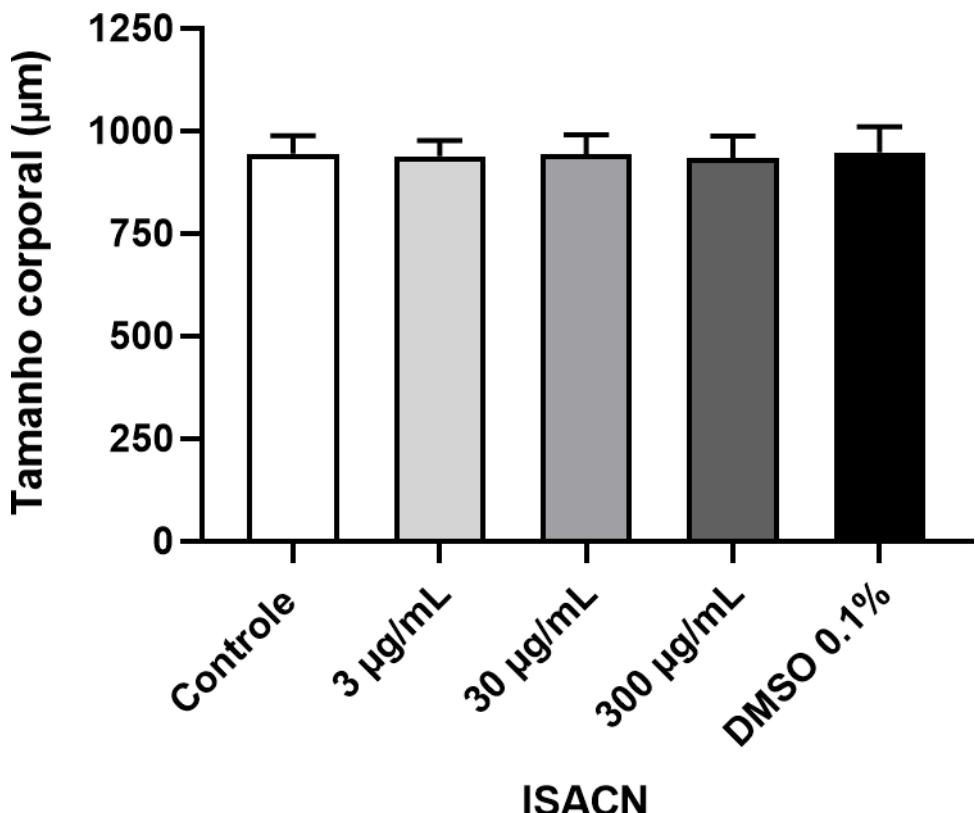
Portanto, nessas concentrações, o derivado da isatina testado não apresentou toxicidade relevante frente ao padrão alimentar de *C. elegans* e os seus respectivos mecanismos envolvidos.

#### **5.4 Ensaio de desenvolvimento corporal**

Um dos parâmetros que podem ser analisados em estudos toxicológicos *in vivo* é a alteração no desenvolvimento dos animais em experimento. Comumente, utiliza-se a evolução ponderal (ganho e perda de massa) e/ou acompanhamento do tamanho corporal dos animais para avaliar tal parâmetro. (Feitosa *et al.*, 2015; Dietrich *et al.*, 2023)

Variações de peso e tamanho podem indicar alterações nos tecidos musculares, dificuldade de digestão de alimentos e absorção de nutrientes, entre outros. Sugerindo possíveis sinais de toxicidade provenientes da administração da substância teste. Para avaliação de desenvolvimento em *C. elegans* o método mais utilizado é a medição do tamanho do animal, esse que ao atingir a fase adulta, passa por análise microscópica e então tem o seu crescimento mensurado. (Santana *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2015).

**Figura 10:** Crescimento corporal em  $\mu\text{m}$  de *Caenorhabditis elegans* após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.



Não houve diferenças significativas,  $p>0,05$   
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

A partir dos resultados obtidos no gráfico da figura 10 é possível verificar que o derivado ISACN não causou alterações significativas ao desenvolvimento corporal de *C. elegans* nas concentrações testadas. Após medição, foi observado que os animais dos grupos tratados mantiveram o padrão de crescimento dos indivíduos do grupo controle.

Este parâmetro em *C. elegans* apresenta boa sensibilidade, sendo significativo na maioria dos estudos com substâncias comprovadamente tóxicas. Miao Xiangzhen e colaboradores, em 2020, realizaram estudos de neurotoxicidade com o alcaloide harmina, utilizando o modelo animal de *C. elegans*. Para avaliar o desenvolvimento corporal dos animais foi adotada a mesma metodologia do presente estudo e ao analisar os resultados constatou-se uma redução de 40% no tamanho dos animais tratados em comparação com os animais do grupo controle, indicando que a substância foi capaz de prejudicar o desenvolvimento destes, corroborando com outras metodologias utilizadas, como o teste de motilidade, onde

também foram encontrados indícios de toxicidade.

Em condições ideais, o adulto de *C. elegans* pode atingir 1mm de comprimento (Brenner *et al.*, 2002). Nesse sentido, os animais submetidos ao tratamento com ISACN alcançaram taxas de crescimento semelhantes, indicando baixa toxicidade e influência da substância frente ao desenvolvimento dos vermes nas concentrações testadas.

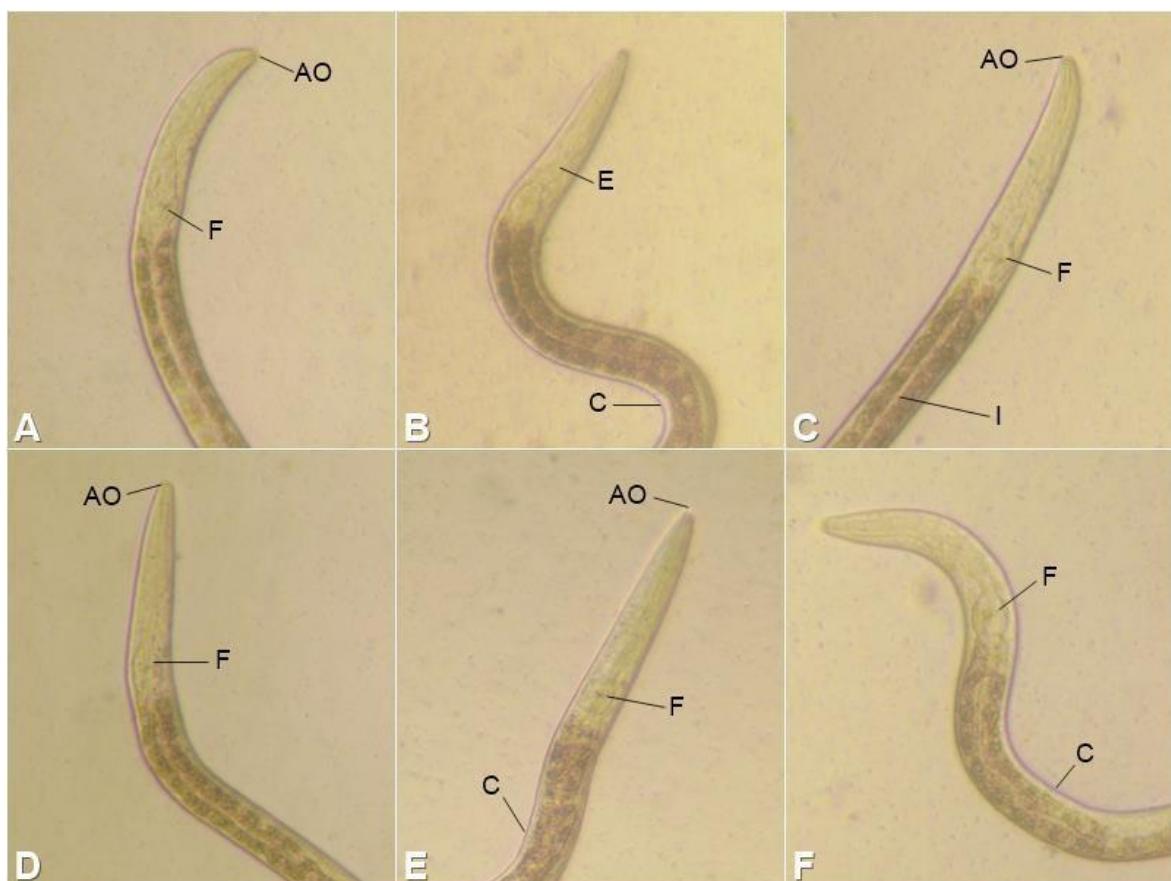
## 5.5 Ensaio de análise morfológica

A análise morfológica de animais em testes toxicológicos é fundamental para compreender os efeitos das substâncias no organismo estudado. Em complemento aos testes bioquímicos e comportamentais que ofereçam uma visão ampliada da toxicidade, a avaliação morfológica permite identificar danos específicos em tecidos, órgãos e sistemas, ampliando a compreensão das lesões provocadas (Witkowska *et al.*, 2022).

No caso do *Caenorhabditis elegans*, essa análise é facilitada pela transparência do corpo do animal, que possibilita a observação direta de células e tecidos ao microscópio sem a necessidade de procedimentos invasivos ou uso de corantes específicos (Kinser *et al.*, 2017).

Assim, em experimentos toxicológicos com *C. elegans*, a análise morfológica torna-se essencial para detectar malformações e defeitos no desenvolvimento do animal, que podem ser resultados da exposição a substâncias químicas. Alterações na estrutura de tecidos como músculos, intestino, sistema reprodutivo e a própria cutícula podem servir como indicadores importantes dos efeitos tóxicos do composto analisado (Akhatova *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2017).

**Figura 11:** Análise morfológica da extremidade anterior de *Caenorhabditis elegans* após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.



(A e B) grupo controle, destaque para a abertura oral, esôfago, farínge e cutícula; (C) ISACN 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , evidenciando a abertura oral, farínge e intestino; (D) ISACN 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mostrando a abertura oral e a faringe; (E) ISACN 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  destacando a abertura oral, farínge e cutícula; (F) DMSO 0,1%, destaque para a farínge e cutícula. Figura em aumento de 10X – microscópio digilab DI-115b.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Na figura 11A e 11B é possível observar a morfologia dos animais do grupo controle, os quais se apresentaram de forma íntegra, com estrutura da abertura oral (AO) preservada, seguido pelo esôfago (E) conectando a faringe (F) sem alterações evidentes, cutícula (C) íntegra e de fácil visualização.

Na figura 11C o animal tratado com 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ISACN se apresentou de forma intacta, com todas as estruturas preservadas, ênfase para o intestino (I) com delimitações claras e bem centralizado.

As figuras 11D e 11E representam, respectivamente, os animais tratados com as concentrações de 30 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ISACN. Enquanto o animal na foto 11F pertence ao grupo DMSO 0,1%. Todos estes mantiveram sua morfologia, sem

alterações evidentes, com abertura oral preservada, faringe aparente e cutícula intacta e bem delimitada.

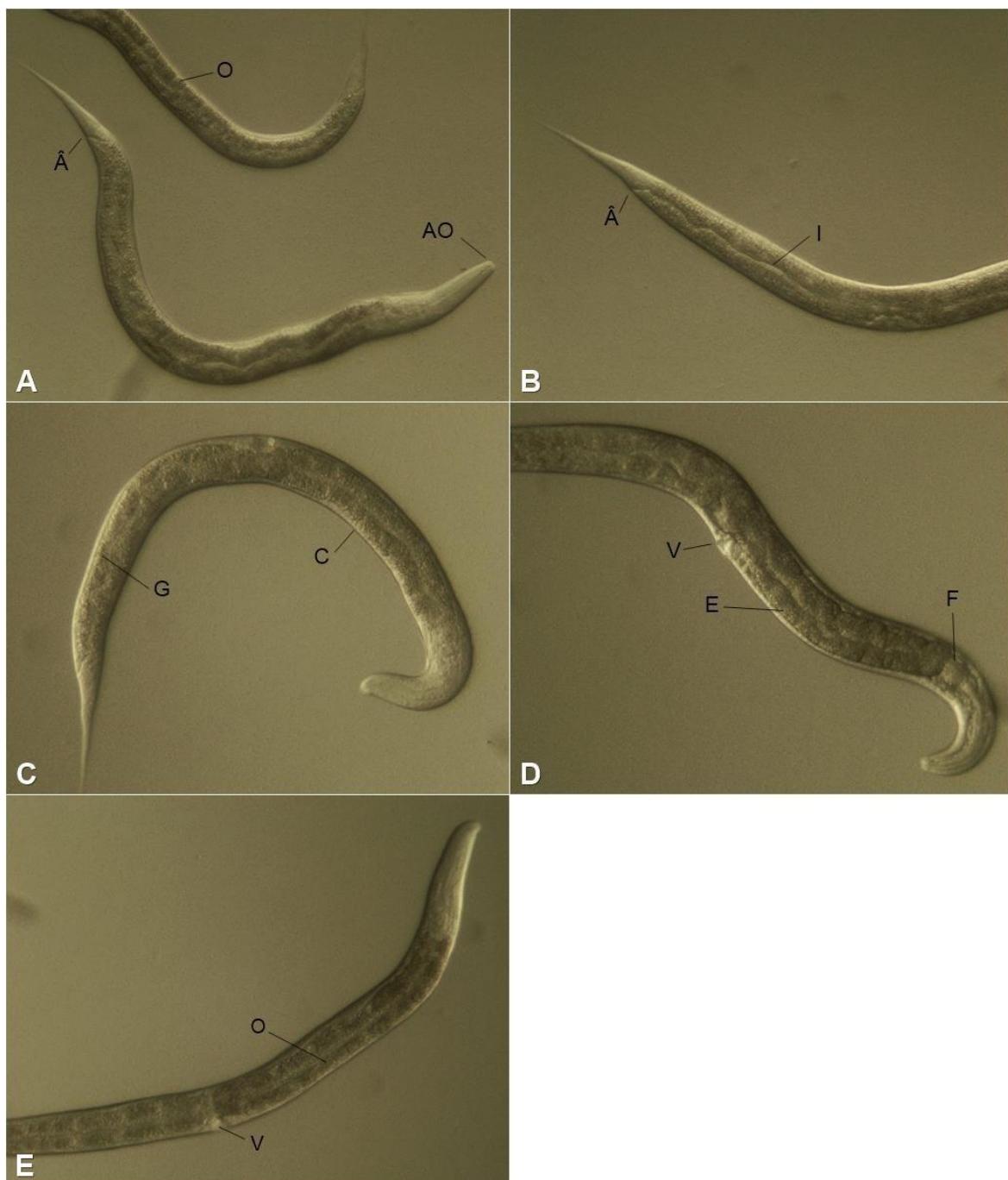
Os animais ilustrados em 12A são representantes do grupo controle, 12B, 12C e 12D são imagens dos vermes tratados com 3, 30 e 300 µg/mL de ISACN, respectivamente, enquanto 12E pertence ao grupo DMSO 0,1%.

Da mesma forma que na figura 11, os animais também se apresentaram íntegros com sua morfologia preservada. Em 12A e 12B é possível verificar todos os componentes do sistema digestório começando na abertura oral (AO) e finalizando no ânus (Â), com destaque para o intestino (I) bem delimitado. Ainda, estruturas do sistema reprodutivo são vistas nas figuras seguintes, como as gônadas (G) com presença de ovócitos (O) e embriões (E), e vulva (V). A cutícula em todas as situações mostrou-se bem delimitada e íntegra.

Palermo (2021) realizou um estudo semelhante, utilizando o extrato de *Stachytarpheta schottiana* rico em alcaloides. Neste trabalho, as concentrações mais baixas testadas já foram capazes de causar alterações estruturais, como desprendimento da cutícula, esôfago irregular, órgãos mal delimitados, entre outros indicativos de toxicidade. Esses que não foram encontrados no presente trabalho.

Assim, comparando os resultados obtidos com informações padronizadas na literatura sobre a morfologia do animal, constatou-se que o derivado da isatina ISACN não foi capaz de causar mudanças estruturais no organismo de *C. elegans* nas concentrações testadas, indicando que o composto tenha baixa toxicidade e potencial de promover alterações morfológicas aos vermes.

**Figura 12:** Análise morfológica de *Caenorhabditis elegans* após 48 horas de tratamento com ISACN em diferentes concentrações.



(A) grupo controle, destaque para a abertura oral, ânus e presença de ovos no interior do verme adulto; (C) ISACN 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , evidenciando o intestino bem delimitado e o ânus do animal; (D) ISACN 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mostrando a cutícula e gônadas; (E) ISACN 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  destacando a vulva aparente e embriões circulares no interior do animal adulto, ainda é possível observar a faringe; (F) DMSO 0,1%, destaque para a faringe e cutícula. Figura em aumento de 10X – microscópio digilab DI-115b.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

## **6 CONCLUSÕES**

O presente estudo toxicológico não clínico avaliou a toxicidade do derivado ISACN em modelo de *Caenorhabditis elegans*, por diferentes metodologias.

Dessa forma, com os resultados obtidos a partir da comparação dos grupos tratados com o grupo controle, foi observado que no ensaio de eclosão de ovos, o derivado da isatina não induziu toxicidade embrionária significativa em nenhuma das concentrações testadas. Já no ensaio de motilidade, a concentração mais alta foi capaz de alterar a contagem de flexões corporais do nematoide, indicando que a substância provocou certo grau de toxicidade neuromotora ao organismo. Ainda, na metodologia de quantificação de batimentos faríngeos, o parâmetro não foi significativamente alterado em nenhum dos grupos tratados. Assim como no experimento de desenvolvimento corporal, onde nenhum dos tratamentos afetou o crescimento dos animais. Por fim, o estudo morfológico dos nematoides submetidos ao tratamento com ISACN também não apresentou alterações, constatando que a substância nas doses testadas não foi capaz de causar danos estruturais aos animais.

Os resultados alcançados com este modelo *in vivo* alternativo agregam informações acerca do nível de toxicidade desse novo derivado. Sendo assim, foi possível concluir que nas concentrações testadas (3, 30 e 300 µg/mL) o derivado 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (ISACN) apresentou baixa toxicidade frente ao organismo teste, corroborando com estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, onde foi avaliada a toxicidade *in vivo* do derivado ISACN em modelo animal de camundongo, categorizando essa substância na classificação 4 de toxicidade oral GHS, que indica baixa toxicidade, com uma estimativa de DL50 de 2000 mg/kg, segundo o fluxograma.

## REFERÊNCIAS

- AKHATOVA, F. et al. Nematode epicuticle visualisation by peakforce tapping atomic force microscopy. **Bio-Protocol**, [s. l.], v. 7, n. 21, e2596, 5 nov. 2017.
- ANNE, C. Hart. Behavior WormMethods. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2006.
- AUGSTEN, Lucas Volnei. Avaliação in vitro de atividade antitumoral e toxicidade de híbridos cumarina-triazol. 2022.
- AVERY, L.; SHTONDA, B. B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 14, p. 2441-2457, 15 jul. 2003.
- BONNARD, E.; LIU, J.; ZJACIC, N.; ALVAREZ, L.; SCHOLZ, M. Automatically tracking feeding behavior in populations of foraging *C. elegans*. **eLife**, [s. l.], v. 11, e77252, 9 set. 2022.
- BRASSINGA, A. K. C.; SIFRI, C. D. The *Caenorhabditis elegans* model of Legionella infection. **Methods in Molecular Biology**, v. 1921, p. 371-397, 2019.
- BRATANICH, A. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. **Archives of Virology**, v. 159, p. 2843-2851, 2014.
- CARRETERO, M.; SOLIS, G. M.; PETRASCHECK, M. *C. elegans* as model for drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 18, p. 2067-2076, 2017.
- 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, 2015.
- DÍAZ, L. et al. Ethical considerations in animal research: the principle of 3R's. **Revista de Investigación Clínica**, v. 73, n. 5, 7 maio 2020.
- DIETRICH, T. et al. Nesting behavior is associated with body weight and grip strength loss in mice suffering from experimental arthritis. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 23087, 28 dez. 2023.
- DING, Zhen; ZHOU, Minfeng; ZENG, Cheng. Recent advances in isatin hybrids as potential anticancer agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 3, p. 1900367, 2020.
- FEITOSA, C. M. et al. Ensaios pré-clínicos em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleilglicerol, constituinte isolado de *Platonia insignis*. **ConScientiae Saúde**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 555-567, 2015.
- FREIRES, I. A.; SARDI, J. C.; DE CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L. Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or

- burden? **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 681-686, abr. 2017.
- GLOVER, V. et al. Isatin: Identity with the Purified Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitor Tribulin. **Journal of Neurochemistry**, p. 656–659, 1988.
- HAN, G. C. et al. Effects of lanthanum nitrate on behavioral disorder, neuronal damage and gene expression in different developmental stages of *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 465, p. 153012, jan. 2022.
- HARLOW, P. H. et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a tool to predict chemical activity on mammalian development and identify mechanisms influencing toxicological outcome. **Scientific Reports**, v. 6, p. 22965, mar. 2016.
- HENKE, A. N.; CHILUKURI, S.; LANGAN, L. M.; BROOKS, B. W. Reporting and reproducibility: Proteomics of fish models in environmental toxicology and ecotoxicology. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 2024, 20 fev. 2024.
- HERNANDO, G.; BOUZAT, C. Evaluating anthelmintic activity through *Caenorhabditis elegans* egg hatching assay. **MethodsX**, v. 12, p. 102743, maio 2024.
- HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 50-59, jan. 2017.
- ILIFF, A. J.; XU, X. Z. *C. elegans*: a sensible model for sensory biology. **Journal of Neurogenetics**, v. 34, n. 3-4, p. 347-350, set./dez. 2020.
- ISHITA, Y.; CHIHARA, T.; OKUMURA, M. Serotonergic modulation of feeding behavior in *Caenorhabditis elegans* and other related nematodes. **Neuroscience Research**, v. 154, p. 9-19, maio 2020.
- KALETTA, T.; HENGARTNER, M. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 387-399, 2006.
- KIM, K. W.; JIN, Y. Neuronal responses to stress and injury in *C. elegans*. **FEBS Letters**, v. 589, n. 14, p. 1644-1652, 22 jun. 2015.
- KINSER, H. E.; PINCUS, Z. High-throughput screening in the *C. elegans* nervous system. **Molecular and Cellular Neurosciences**, [s. l.], v. 80, p. 192-197, abr. 2017.
- KIPREOS, E. T.; VAN DEN HEUVEL, S. Developmental Control of the Cell Cycle: Insights from *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, 2019.
- KNUDSEN, L. E. et al. Nordic symposium on "toxicology and pharmacology without animal experiments-Will it be possible in the next 10 years?". **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 124, n. 5, p. 560-567, maio 2019.

- KUDELSKA, M. M.; HOLDEN-DYE, L.; O'CONNOR, V.; DOYLE, D. A. Concentration-dependent effects of acute and chronic neonicotinoid exposure on the behaviour and development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 1345-1351, jul. 2017.
- KUWAHARA, T. The Functional Assessment of LRRK2 in *Caenorhabditis elegans* Mechanosensory Neurons. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 2322, p. 175-184, 2021.
- LEE, T. Y.; YOON, K. H.; LEE, J. I. Cultivation of *Caenorhabditis elegans* in three dimensions in the laboratory. **Journal of Visualized Experiments**, n. 118, p. 55048, dez. 2016.
- LIMA-JUNIOR, C. G. et al. Synthesis, cytotoxic activity on leukemia cell lines and quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies of Morita-Baylis-Hillman adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 602-612, 2016.
- MATHUR G.; NAIN, S. Recent Advancement in Synthesis of Isatin as Anticonvulsant Agents: A Review. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 417–427, 2014.
- MELIS, C.; et al. Isatin: a privileged scaffold for the design of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 68-73, 2017.
- MEYER, D.; WILLIAMS, P. L. Toxicity testing of neurotoxic pesticides in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 17, n. 5, p. 284-306, 2014.
- MIAO, X.; ZHANG, X.; YUAN, Y.; ZHANG, Y.; GAO, J.; KANG, N.; LIU, X.; WU, J.; LIU, Y.; TAN, P. The toxicity assessment of extract of *Peganum harmala* L. seeds in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 256, 17 ago. 2020.
- MITANI, S. Comprehensive functional genomics using *Caenorhabditis elegans* as a model organism. **Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences**, [s. l.], v. 93, n. 8, p. 561-577, 2017.
- MOHAMMADI ZIARANI, G.; MORADI, R.; AHMADI, T.; LASHGARI, N. Recent advances in the application of indoles in multicomponent reactions. **RSC Advances**, v. 8, n. 22, p. 12069-12103, mar. 2018.
- MUNNANGI, S. R.; YOUSSEF, A. A. A.; NARALA, N.; LAKKALA, P.; NARALA, S.; VEMULA, S. K.; REPKA, M. Drug complexes: perspective from academic research and pharmaceutical market. **Pharmaceutical Research**, v. 40, n. 6, p. 1519-1540,

2023.

- NAJMI, A.; JAVED, S. A.; AL BRATTY, M.; ALHAZMI, H. A. Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 349, 2022.
- PAGE, A. P.; JOHNSTONE, I. L. The cuticle. **WormBook**, p. 1-15, 19 mar. 2007.
- PALERMO, Bárbara Cristina Ferreira. Avaliação do efeito do extrato bruto da planta *Stachytarpheta schottiana* na sobrevivência e morfologia de *Caenorhabditis elegans*. **Campus UFRJ-Macaé, Macaé**, 2021.
- PETRATOU, D.; FRAGKIADAKI, P.; LIONAKI, E.; TAVERNARAKIS, N. Assessing locomotory rate in response to food for the identification of neuronal and muscular defects in *C. elegans*. **STAR Protocols**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 102801, 15 mar. 2024.
- RAIZEN, D. M.; CULLISON, K. M.; PACK, A. I.; SUNDARAM, M. V. A novel gain-of-function mutant of the cyclic GMP-dependent protein kinase egl-4 affects multiple physiological processes in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 173, n. 1, p. 177-187, 2012.
- RAIZEN, David; SONG, Bo-mi; TROJANOWSKI, Nick. Methods for measuring pharyngeal behaviors. **The C. elegans Research Community, WormBook**. 2012.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. Foundations of Parasitology. 8. ed. **Saint Louis: McGraw-Hill**, 2009.
- ROMUSSI, S.; GIUNTI, S.; ANDERSEN, N.; DE ROSA, M. J. *C. elegans*: a prominent platform for modeling and drug screening in neurological disorders. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 19, n. 5, p. 565–585, 2024.
- ROTELLA, D. P. The critical role of organic chemistry in drug discovery. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 1315-1316, 2016.
- ROY, S. et al. Synthesis, Characterization, Antioxidant Status, and Toxicity Study of Vanadium–Rutin Complex in Balb/c Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 166, p. 183–200, 2015.
- RUSZKIEWICZ, J. A.; PINKAS, A.; MIAH, M. R.; WEITZ, R. L.; LAWES, M. J. A.; AKINYEMI, A. J.; IJOMONE, O. M.; ASCHNER, M. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 354, p. 126-135, 1 set. 2018.
- SANDNER, G.; KÖNIG, A.; WALLNER, M.; WEGHUBER, J. Alternative model organisms for toxicological fingerprinting of relevant parameters in food and nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 62, n. 22, p.

- 5965-5982, 2022.
- SANT'ANNA, V.; VOMMARO, R. C.; SOUZA, W. DE. *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of antihelminthic compounds: ultrastructural study of the effects of albendazole. **Experimental Parasitology**. v. 135, n. 1, p. 1-8. 2013
- SANTANA, L. C. L. R. et al. Estudo das propriedades físico-químicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 670-678, 2014.
- SHAHAM, S. Glial development and function in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 4, p. a020578, 8 jan. 2015.
- STAGG, N. J.; GHANTOUS, H. N.; ROTH, R.; HASTINGS, K. L. Predictivity/translatability of toxicities observed in nonclinical toxicology studies to clinical safety outcomes in drug development: case examples. **International Journal of Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 141-150, mar./abr. 2020.
- STEELE, L. M.; SEDENSKY, M. M. Approaches to anesthetic mechanisms: The *C. elegans* model. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 602, p. 133-151, 2018.
- TROJANOWSKI, N. F.; FANG-YEN, C. Simultaneous optogenetic stimulation of individual pharyngeal neurons and monitoring of feeding behavior in intact *C. elegans*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1327, p. 105-119, 2015.
- VARUN; SONAM; KAKKAR, R. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. **MedChemComm**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 351-368, 15 jan. 2019.
- VIDAL-GADEA, A. G. et al. Coordination of behavioral hierarchies during environmental transitions in *Caenorhabditis elegans*. **Worm**, v. 1, n. 1, p. 5-11, jan. 2012.
- WANG, Ying I.; ABACI, Hasan Erbil; SHULER, Michael L. Microfluidic blood–brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 184-194, 2017.
- WANI, K. A.; GOSWAMY, D.; IRAZOQUI, J. E. Nervous system control of intestinal host defense in *C. elegans*. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], jun. 2020.
- WITKOWSKA, M.; FLOREK, E.; MRÓWCZYŃSKI, R. Assessment of pristine carbon nanotubes toxicity in rodent models. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 23, p. 15343, 5 dez. 2022.

XAVIER, F. J. S. et al. Atividade vasorrelaxante de adutos de Morita-Baylis-Hillman derivados do Eugenol em artéria mesentérica superior de ratos normotensos. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 4, 2019.

XIAO-YING et al. Utilization of *Caenorhabditis elegans* in laboratory teaching of genetics. **Yi Chuan**, v. 39, n. 8, p. 763-768, ago. 2017.

XIONG, H.; PEARS, C.; WOOLLARD, A. An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 9839, 29 ago. 2017.

XU, Z.; et al. Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. **Chinese Chemical Letters**, v.28, n. 2, p. 159-167, 2017.

YANG, H. C.; HUNG, C. Y.; PAN, Y. Y.; LO, S. J.; CHIU, D. T. Lipidomic analysis of *Caenorhabditis elegans* embryos. **Bio-Protocol**, [s. l.], v. 7, n. 18, e2554, 20 set. 2017.

ZAIN, M. M.; YAHDAYA, 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, suppl. 1, p. 3-8, nov. 2016.

ZHANG, Qian et al. 5-Acetamido-1-(methoxybenzyl) isatin inhibits tumor cell proliferation, migration, and angiogenesis. **RSC Advances**, v. 9, n. 63, p. 36690-36698, 2019.

ZHANG, Y. Z.; DU, H. Z.; LIU, H. L.; HE, Q. S.; XU, Z. Isatin dimers and their biological activities. **Archives of Pharmacy (Weinheim)**, v. 353, n. 3, p. e1900299, mar. 2020.