

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - CAMPUS MACAÉ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E CONSERVAÇÃO

NOELE BORGES MAGALHÃES FAGUNDES

**Avaliação do efeito anti-helmíntico do extrato bruto e metabólito elatol
obtidos da alga *Laurencia dendroidea* no modelo experimental
*Caenorhabditis elegans***

Macaé
2019

**Avaliação do efeito anti-helmítico do extrato bruto e metabólito elatol
obtidos da alga *Laurencia dendroidea* no modelo experimental
*Caenorhabditis elegans***

NOELE BORGES MAGALHÃES FAGUNDES

Defesa de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Orientadora: Aleksandra Oliveira Menezes, D.Sc.

Co-orientadora: Júlia Peralta Gonçalves, D.Sc.

Macaé
Junho de 2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca do NUPEM/UFRJ

CIP - Catalogação na Publicação

F156a Fagundes, Noele Magalhães
Avaliação do efeito anti-helmíntico do extrato bruto e metabólito elatol obtidos da alga *Laurencia dendroidea* no modelo experimental *Caenorhabditis elegans* / Noele Magalhães Fagundes. -- Rio de Janeiro, 2019.
107 f.

Orientadora: Aleksandra Menezes Oliveira.
Coorientadora: Júlia Peralta Gonçalves.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós Graduação em Zoologia, 2019.

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. *Laurencia dendroidea*. 3. Extrato bruto . 4. Elatol. I. Oliveira, Aleksandra Menezes, orient. II. Gonçalves, Júlia Peralta, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Avaliação do efeito anti-helmíntico do extrato bruto e metabólito elatol obtidos da alga
Laurencia dendroidea no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*

Noele Borges Magalhães Fagundes

Aleksandra Oliveira Menezes

Júlia Peralta Gonçalves

Defesa de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Presidente, Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Macaé

Junho de 2019

“Human truths, however valuable they seem, are always open to challenge, revision, to refinement, to refutation, to repeal. Only the question is eternal.”
(Andre Geurard)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que iluminou e guiou meus passos, em sua infinita sabedoria.

Agradeço aos meus pais, Marcílio e Edvânia e minha irmã, Noara por serem meus anjos da guarda. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais importantes de minha vida! Esta conquista também é de vocês!

Ao meu marido, Hernandes, pelo incentivo, carinho e compreensão; e por ser meu eterno companheiro de jornada.

Ao meu querido filho Heitor, que foi minha inspiração e o incentivo para querer crescer mais sempre. Obrigada pela compreensão em todos os momentos que precisei...

Ao meu filho querido César, que acompanhou toda a jornada e está nascendo junto com esta conquista!!!

Às minhas avós Maria José e Dorvalina, que estão em constante oração por mim.

Às minhas orientadoras, Aleksandra Menezes e Júlia Peralta, sem as quais jamais teria chegado até aqui. Obrigada por acreditarem em mim! Serei eternamente grata pelo apoio, incentivo, paciência e ensinamentos.

À querida Bárbara, grande companheira, que me deu a oportunidade de ensinar...

À minha querida afilhada Izadora, com quem sempre posso contar!

Minha gratidão a minha querida amiga Evilane, que com seu carinho me incentivou...

Agradeço a toda equipe do laboratório de Imunoparasitologia, em especial prof. Suzana, Arieli e Fernanda, pela grande ajuda em todos os momentos que precisei.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela colaboração financeira para a realização deste projeto.

RESUMO

Avaliação do efeito anti-helmíntico do extrato bruto e metabólito elatol obtidos da alga *Laurencia dendroidea* no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*

Noele Borges Magalhães Fagundes

Resumo de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências ambientais e de Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

As infecções por helmintos constituem um dos mais graves problemas de saúde pública. Fármacos anti-helmínticos são o principal suporte de controle de nematoides. Os produtos naturais são conhecidos por sua atividade anti-helmíntica. Espécies de algas do gênero *Laurencia* apresentam atividade contra diversos parasitos, porém a espécie *L. dendroidea* ainda não possui seu efeito descrito em helmintos. *Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre, utilizado como modelo experimental. O objetivo foi avaliar o efeito de extrato bruto e do metabólito elatol de *Laurencia dendroidea* em diferentes concentrações na sobrevivência de helmintos adultos e eclosão de larvas L1 de *C. elegans* e alterações morfológicas nos nematoides adultos. Observou-se diminuição estatisticamente significativa da sobrevivência de adultos com a ivermectina (controle positivo) a 5, 10 e 20nM, extrato bruto a 500, 600, 700 e 800ng/mL e elatol a 100mM, obtendo-se IC₅₀ de 0,1354nM, 261,2ng/mL e 67,07mM respectivamente. Na concentração do IC₅₀, apenas a ivermectina exerceu efeito na eclosão das larvas L₁ de *C. elegans*, mostrando que o efeito do extrato bruto e do elatol ocorre em formas mais maduras. As avaliações morfológicas mostraram que no controle e DMSO, os helmintos adultos apresentavam-se íntegros. Nos grupos tratados com as diversas concentrações de ivermectina, extrato bruto e elatol, foi possível observar descamações cuticulares, extravasamento de estruturas internas, vacuolização e má formação ou ausência de ovos em hermafroditas adultos. Podemos concluir que o extrato bruto e o elatol de *L. dendroidea* causaram diminuição da sobrevivência e alterações diversas na morfologia de adultos de *C. elegans*.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*, *Laurencia dendroidea*, extrato bruto, elatol

Macaé,
Junho de 2019

Abstract

Evaluation of the anthelmintic effect of crude extract and metabolite elatol obtained from the *Laurencia dendroidea* algae in the experimental model *Caenorhabditis elegans*

Noele Borges Magalhães Fagundes

Abstract da Defesa de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências ambientais e de Conservação da Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Helminth infections are one of the most serious public health problems. Anti-helminthic drugs are the main support for nematode control. Natural products are known for their anthelmintic activity. Species of algae of the genus *Laurencia* have activity against several parasites, but to species *L. dendroidea* doesn't have its effect described in helminths. *Caenorhabditis elegans* is a free-living nematode, used as an experimental model. The objective was to evaluate the effect of crude extract and the metabolite elatol of *Laurencia dendroidea* in different concentrations in the survival of adult helminths and hatching of larvae L1 of *C. elegans* and to evaluate the morphological alterations in adult nematodes. A statistically significant decrease in survival of adults with ivermectin (positive control) at 5, 10 and 20nM, crude extract at 500, 600, 700 and 800ng / ml and elatol at 100mM was observed, obtaining IC₅₀ of 0.1334nM, 261.2 ng / mL and 67.07 mM respectively. At the IC₅₀ concentration, only ivermectin exerted an effect on the hatching of the L1 larvae of *C. elegans*, showing that the effect of the crude extract and elatol occurs in mature forms. The morphological evaluations showed that in the control and DMSO conditions, the adult helminths were intact. In the groups treated with the various concentrations of ivermectin, Azeda extract and elatol, it was possible to observe cuticular peeling, extravasation of internal structures, vacuolization and malformation or absence of eggs in adult hermaphrodites. We can conclude that *L. dendroidea* crude extract and elatol caused a decrease in survival and various alterations in the adult morphology of *C. elegans*.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, *Laurencia dendroidea*, crude extract, elatol

Macaé,
Junho de 2019

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fármacos registrados para tratamento de helmintíases em humanos. Adaptado de Holdendye et al., 2014.	13
Tabela 2- Locais de coleta das amostras estudadas. Adaptado de Machado <i>et al.</i> , 2016.....	18
Tabela 3- Conteúdo relativo de sesquiterpenos expressos em porcentagem de compostos obtidos por análise de extratos de diferentes populações. Valores são o significado \pm desvio padrão, n=15. Adaptado de Machado <i>et al.</i> , 2016.....	18
Tabela 4- Alterações morfológicas observadas em cada concentração utilizada.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variação anual no percentual de positividade de geo-helmintos em áreas de busca ativa da esquistossomose (2005 a 2016). Adaptado de Brasil, 2018	2
Figura 2- Dados para geo-helmintíases levantados por região. Variação regional no percentual de positividade de geohelmintos em áreas de busca ativa da esquistossomose (2005/2016). Adaptado de Brasil, 2018.	2
Figura 3 - Morfologia de um adulto hermafrodita. A- Microscopia óptica de um adulto hermafrodita, lado esquerdo lateral. Escala 0,1mm. B. Desenho esquemático mostrando as principais estruturas internas (Altun, 2005).	7
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> (Altun, 2005).	8
Figura 5- Organização e estrutura da cutícula de <i>Caenorhabditis elegans</i>. A- Microscopia eletrônica de varredura da superfície de um adulto, acompanhada de uma representação esquemática. B- Micrografia de transmissão retratando uma secção longitudinal da cutícula do adulto destacando a estrutura distinta das camadas e sua composição. Com exceção da epicutícula e da superfície, o colágeno está presente na maioria das camadas. C- retrata a síntese de uma nova cutícula e ao destacamento da cutícula antiga. O padrão de estriação da camada externa da cutícula é estabelecido por invaginações na superfície da membrana hipodérmica, e é restrito à camada externa da cutícula. Adaptado de Page et al., 2007.	11
Figura 6: Esquema do ensaio de escolha binária com nematoides expostos ao extrato Azeda e ao elatol. Adaptado de Meisel e Kim, 2014.....	26
Figura 7: Percentual de sobrevivência de formas adultas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com ivermectina. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).....	27
Figura 8: Percentual de sobrevivência de formas adultas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com o extrato bruto AZEDA da alga <i>Laurencia dendroidea</i>. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).	28
Figura 9: Percentual de sobrevivência de formas adultas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com o elatol. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).....	29
Figura 10: Percentual de eclosão de larvas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com o extrato bruto AZEDA da alga <i>Laurencia dendroidea</i>. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P > 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).	30
Figura 11: Percentual de eclosão de larvas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com a ivermectina na concentração do IC_{50} de $0,134nM$. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).	31
Figura 12: Percentual de eclosão de larvas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com o extrato bruto na dose do IC_{50} de $261,2ng/mL$. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).	32

Figura 13: Percentual de eclosão de larvas de <i>Caenorhabditis elegans</i> após tratamento com o elatol na dose do IC₅₀ de 67,07mM. Os valores são a média ± erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (P<0,05 One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).	33
Figura 14: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto não tratados e tratados com DMSO 0,01%. A-Região anterior (RA) mostrando a cutícula íntegra (Barra 50 µm). B- Região anterior (RA) mostrando estruturas morfológicas íntegras, como faringe e bulbo (Barra 50 µm). C- Útero com ovos (Barra 50 µm). D- Região Anterior (RA) e Região Posterior (RP) de um adulto evidenciando as estruturas morfológicas íntegras (Barra 100 µm). E- Adulto tratado com DMSO 0,01%. Região anterior (RA), região posterior (RP) e cutícula intacta (c) (Barra 500 µm).	35
Figura 15: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com ivermectina 1nM através da microscopia ótica. A- Região anterior (RA) mostrando degradação de estruturas internas, inclusive com a presença de ovo (o) nesta região (Barra 500 µm). B- Setas apontando áreas de descamação da cutícula (Barra 500 µm).	37
Figura 16: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com ivermectina 5nM através da microscopia ótica. A-Região anterior (RA) mostrando intensa degradação de estruturas internas (Barra 500 µm). B-Extensiva formação de pequenos vacúolos (v). Região anterior (RA) e região posterior (RP) (Barra 500 µm). C- Adulto tratado com ivermectina a 5nM. Região anterior (RA). Severa destruição de estruturas internas (Barra 500 µm).	39
Figura 17: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com ivermectina 10nM através da microscopia ótica. A- Descamação cuticular em diversas partes do helminto (Setas menores). Região anterior (RA) e região posterior (RP) (Barra 500 µm). B- Região anterior (RA). Extensiva formação de pequenos vacúolos(v) (Barra 500 µm).	41
Figura 18: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com ivermectina 20nM através da microscopia ótica. A- Região anterior (RA) mostrando intensa degradação de estruturas internas (Barra 500 µm). B-Severa destruição de estruturas internas e descamação da cutícula em diversas regiões. Região anterior (RA) e região posterior (RP) (Barra 500 µm).	43
Figura 19: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com extrato bruto 400ng/ml através da microscopia ótica. A- Larvas que eclodiram dentro do adulto proveniente de ovos que permaneceram dentro do adulto, mostrando o fenômeno conhecido como eclosão intrauterina (Barra 500 µm). B- Região anterior (RA) e região posterior (RP). As setas pequenas marcam regiões de lesão na cutícula (Barra 500 µm).....	45
Figura 20: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com extrato bruto 500ng/ml através da microscopia ótica. A- Região anterior (RA). As setas menores apontam para locais de descamação cuticular e há severa destruição de estruturas internas (Barra 200 µm). B-Intensa formação de pequenos vacúolos (Barra 500 µm).	47
Figura 21: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com extrato bruto 600ng/ml através da microscopia ótica. A-Região anterior (RA) mostrando o fenômeno conhecido como eclosão intrauterina (Barra 500 µm). B- Seta mostrando larva eclodida dentro do adulto com estruturas morfológicas formadas, neste caso faringe (Barra 200 µm).....	49
Figura 22: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com extrato bruto 700ng/ml através da microscopia ótica. A- Região anterior (RA) e região posterior (RP). Eclosão intrauterina (Barra 500 µm). B- Setas mostram regiões da cutícula que sofreram grande dano (Barra 200 µm). C- Região anterior (RA) e região posterior (RP). As setas pequenas mostram a formação de vacúolos (Barra 500 µm).	51

Figura 23: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratado com extrato bruto 800ng/ml através da microscopia ótica. A- Região anterior (RA) e região posterior (RP), mostrando o fenômeno conhecido como eclosão intrauterina (Barra 500 μ m). B- Setas mostrando a formação de pequenos vacúolos ao longo do corpo (Barra 200 μ m).	53
Figura 24: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 0,1mM. A-Região anterior (RA) mostrando degradação de estruturas internas e setas pequenas apontam para áreas de descamação da cutícula (Barra 50 μ m). B- Região anterior (RA)e região posterior (RP), setas pequenas indicando descamação da cutícula (Barra 50 μ m).	55
Figura 25: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 0,3mM. A- Setas apontam para áreas de descamação da cutícula (Barra 50 μ m). B- Setas pequenas indicando formação de vacúolos (Barra 50 μ m).	57
Figura 26: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 1mM. A-Região anterior (RA)e região posterior (RP) mostrando descamação da cutícula (Barra 50 μ m). B- Região anterior (RA) e região posterior (RP), setas pequenas indicando formação de vacúolos (Barra 50 μ m).	59
Figura 27: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 3mM. A- Região anterior (RA) mostrando degradação de estruturas internas e ovos deformados (Barra 100 μ m). B- Região anterior (RA) mostrando a formação de vacúolos (Barra 50 μ m).	61
Figura 28: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 10mM. A-Região anterior (RA) e região posterior (RP) mostrando degradação de estruturas internas (Barra 100 μ m). B- Região posterior (RP) mostrando ovos em processo de deformação (Barra 50 μ m). C- Região posterior (RP) e setas menores indicando descamação da cutícula (Barra 50 μ m).	63
Figura 29: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 30mM. A- Região anterior (RA) e região posterior (RP) e setas menores mostrando desorganização de estruturas internas (Barra 100 μ m). B- Região posterior (RP) e setas menores indicando descamação da cutícula e extravasamento de conteúdo interno (Barra 50 μ m).	65
Figura 30: Morfologia de <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto tratados com elatol 100mM. A-Região posterior (RP) com setas menores mostrando descamação da cutícula (Barra 50 μ m). B- Região posterior (RP) com as setas pequenas indicando descamação da cutícula (Barra 50 μ m).	67

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Helminthíases	1
1.2	Nematoides	4
1.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	6
1.3.1	Morfologia e Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	7
1.3.2	A Larva “Dauer”	9
1.3.3	Parede do corpo e cutícula.....	10
1.4	Tratamento das helmintíases	12
1.5	Produtos Naturais	14
1.6	<i>Laurencia</i>	16
1.6.1	Elatol.....	20
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Cultivo e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
3.2	Avaliação da atividade de ivermectina, do extrato bruto de <i>Laurencia dendroidea</i> e o metabólito elatol em formas adultas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
3.3	Avaliação da atividade de ivermectina, do extrato bruto de <i>Laurencia dendroidea</i> e o metabólito elatol na eclosão de larvas L1 a partir dos ovos de <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
3.4	Análises estatísticas	24
3.5	Análise morfológica do efeito da ivermectina, do extrato de <i>Laurencia dendroidea</i> e elatol em <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto por microscopia de Luz.	25
3.6	Teste da escolha binária.....	25
4	RESULTADOS	27
4.1	Atividade da ivermectina (IVM) na sobrevivência de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i>	27

4.2	Atividade do extrato bruto da alga <i>Laurencia dendroidea</i> na sobrevivência de adultos de <i>C. elegans</i>	28
4.3	Atividade do elatol na sobrevivência de adultos de <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
4.4	Efeito do extrato bruto de <i>Laurencia dendroidea</i> na eclosão de larvas L1 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	29
4.5	Efeito da ivermectina na concentração do IC ₅₀ na eclosão de larvas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	30
4.6	Efeito do extrato azeda na concentração do IC ₅₀ na eclosão de larvas L1 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	31
4.7	Efeito do elatol na concentração do IC ₅₀ na eclosão de larvas L1 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
4.8	Análise morfológica do efeito dos compostos em <i>Caenorhabditis elegans</i> adultos através de microscopia ótica	33
4.8.1	Controle e controle com DMSO.....	33
4.8.2	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com ivermectina 1nM	36
4.8.3	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com ivermectina 5nM	38
4.8.4	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com ivermectina 10nM 40	
4.8.5	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com ivermectina 20nM 42	
4.8.6	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o extrato bruto AZE 400ng/ml.....	44
4.8.7	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o extrato bruto AZE 500ng/ml.....	46
4.8.8	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o extrato bruto AZE 600ng/ml.....	48
4.8.9	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o extrato bruto AZE 700ng/ml.....	50
4.8.10	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o extrato bruto AZE 800ng/ml.....	52

4.8.11	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 0,1mM...	54
4.8.12	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 0,3mM...	56
4.8.13	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 1mM.....	58
4.8.14	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 3mM.....	60
4.8.15	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 10mM....	62
4.8.16	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 30mM....	64
4.8.17	Alterações morfológicas em <i>Caenorhabditis elegans</i> tratados com o elatol 100mM..	66
4.8.18	Teste da escolha binária em <i>Caenorhabditis elegans</i>	68
5	DISCUSSÃO	69
6	BIBLIOGRAFIA	80

1 Introdução

1.1 Helmintíases

As infecções por helmintos constituem um dos mais graves problemas de saúde pública e estão entre os mais frequentes agravantes de processos infecciosos do mundo. As helmintíases estão presentes, praticamente, em todas as zonas tropicais e subtropicais do planeta, sendo que mais de um bilhão de indivíduos em todo mundo albergam pelo menos uma espécie de parasita intestinal (Fonseca *et al.*, 2010). Pessoas que vivem em locais com poucas condições sanitárias e de higiene possuem maior vulnerabilidade de contaminação e apresentam um ambiente intestinal favorável para o desenvolvimento de parasitos. Fatores como qualidade de vida, moradia e higiene são determinantes no processo de transmissão e desenvolvimento de doenças parasitárias, uma vez que o ciclo de vida de vários parasitos envolve o meio ambiente (água e solo) (Damazio *et al.*, 2013).

A Organização Panamericana da Saúde, da Organização Mundial da Saúde, estima que no mundo 820 milhões de pessoas estão infectadas por *Ascaris lumbricoides*, 460 milhões por *Trichuris trichiura* e 440 milhões por ancilostomídeos. Em 25 países da América Latina e Caribe há cerca de 46 milhões de crianças vivendo em zonas de risco elevado para infecção ou reinfecção por geohelmintos (Brasil, 2018).

No Brasil, estas infecções estão presentes em todas as regiões, ocorrendo principalmente nas zonas rurais e periferias de centros urbanos que se destacam pela ausência de saneamento básico e pouco conhecimento sobre transmissão e prevenção. Os dados apresentados nas figuras 1 e 2 foram levantados durante os inquéritos de Esquistossomose e Geo-helmintíases, realizados entre os anos 2005 e 2016 e indicam que a ocorrência da infecção com estes helmintos tem diminuído nas regiões Sul e Sudeste, mas continuam elevadas nas regiões Norte e Nordeste (Brasil, 2018).

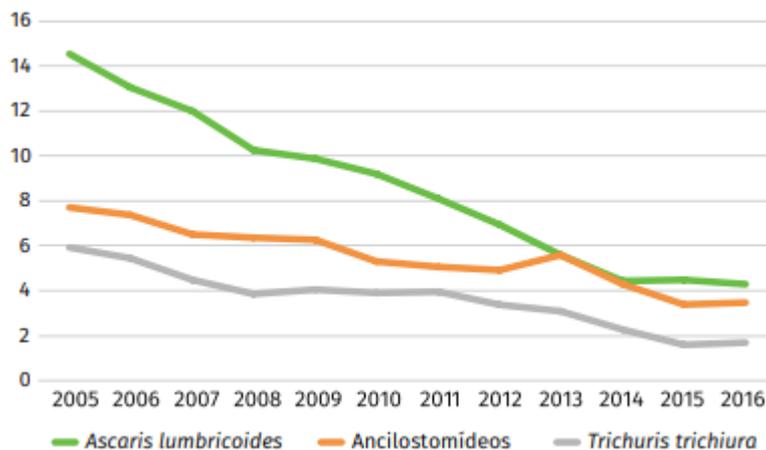


Figura 1 - Variação anual no percentual de positividade de geo-helminths em áreas de busca ativa da esquistossomose (2005 a 2016). Adaptado de Brasil, 2018

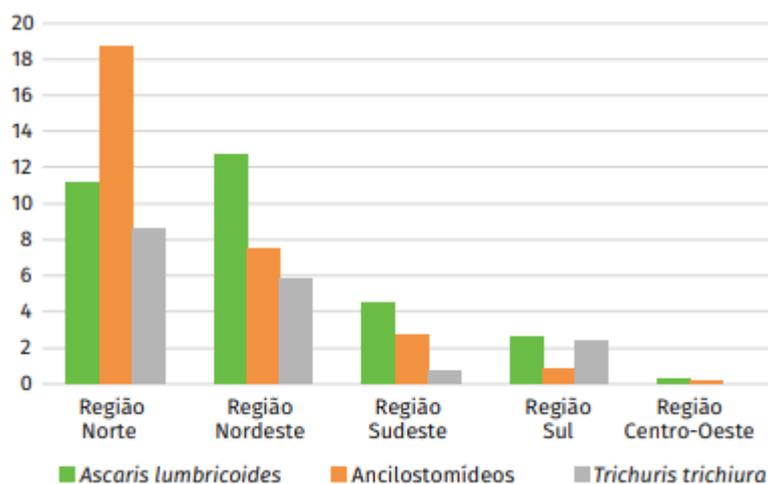


Figura 2- Dados para geo-helminthiasis, levantados por região. Variação regional no percentual de positividade de geohelminths em áreas de busca ativa da esquistossomose (2005/2016). Adaptado de Brasil, 2018.

As crianças são a maior parte da população atingida (Martins *et al.*, 2003). Jovens e crianças em idade escolar possuem maior tendência a abrigar maior número de parasitos intestinais. Dentre as várias consequências destas infecções estão desnutrição, anemia ferropriva, obstrução intestinal, hemorragias, ascites, problemas cerebrais, a depender do tipo de parasito, que resulta em baixa taxa de crescimento, diminuição de aptidão física e prejuízo para a memória e cognição (Crompton, 2002). As enteroparasitoses podem afetar o equilíbrio nutricional (interferindo na absorção de nutrientes, induzindo sangramento intestinal, reduzindo a ingesta alimentar) e também causar complicações significativas (obstrução intestinal, prolapso retal e formação de abscessos) (Martins *et al.*, 2003). As adversas consequências para

a saúde combinadas com o prejuízo para o desenvolvimento educacional, reduzem a participação escolar (Kremer, 2004) e a capacidade de rendimento na vida futura (Bleakley, 2007). Os parasitos intestinais mais frequentemente encontrados em seres humanos e envolvidos nessas infecções são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* e os ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) (Martins *et al.*, 2003).

No caso das geo-helminthíases, as crianças em idade escolar constituem o público alvo ideal para essa intervenção, sendo o grupo de risco mais importante, pois estão em contato contínuo com o solo contaminado e apresentam hábitos higiênicos que muitas vezes não são os mais adequados. O impacto negativo da infecção entre as crianças não tratadas pode produzir, além da redução no desenvolvimento físico e mental, uma diversidade de sintomatologias que incluem diarreia, dores abdominais, inapetência, perda de peso, até processos obstrutivos, levando, em casos extremos, sem intervenção cirúrgica, ao óbito do paciente (Brasil, 2018).

As helmintíases também afetam cães e gatos e são as doenças gastrintestinais mais comuns entre eles. Possuem um papel proeminente relacionado à saúde pública, pois algumas constituem importantes zoonoses, dentre eles as formas larvais de *Ancylostoma* spp., *Toxocara* spp., *Echinococcus granulosus* e *Dipylidium caninum* (Gennari, 2001). Devido à proximidade entre os animais domésticos e humanos, torna-se essencial o diagnóstico e o controle adequado de endoparasitos para reduzir a contaminação ambiental, minimizando os riscos de infecções humanas e animais (Harvey *et al.*, 1991).

Apesar da morbidade e, menos comum, mortalidade que pode estar associada às parasitoses, especificamente no caso de helmintíases, podem ocorrer infecções subclínicas (Oliveira *et al.*, 2016). Os sintomas das parasitoses intestinais são bastante variados, podendo apresentar manifestações clínicas ou não, dificultando o diagnóstico e o controle dessas doenças. Nos quadros leves, as manifestações podem ser inespecíficas, como anorexia, distúrbios do sono, irritabilidade, vômitos ocasionais, diarreia e náuseas. Os quadros mais graves são mais comuns em pacientes imunocomprometidos. Os parasitados assintomáticos contribuem para a disseminação do parasito em seu meio (Afonso *et al.*, 2014).

A criação de gado (corte e leite) é abalada por parasitoses intestinais (Rist *et al.*, 2017), principalmente em regiões tropicais e subtropicais, que sofrem com grandes danos, que elevam a morbidade e a mortalidade dos rebanhos, diminuindo o nível de produção, causando alterações reprodutivas, elevando os custos para controlar estes danos (Schillhorn van Veen, 1997). A alta prevalência de infecções parasitárias e a dificuldade de um controle efetivo e tratamento causa enormes perdas econômicas (Fortes *et al.*, 2013).

Em adição ao dano causado pela elevada mortalidade, as parasitoses intestinais impactam o crescimento, reduzem a produção leiteira e causam baixa fertilidade. Os gêneros que mais afetam a criação de gado no Brasil incluem *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* e *Cooperia*. O custo com produtos veterinários é de aproximadamente 15 bilhões de dólares ao ano, e 27% deste custo é representado por parasiticidas. No Brasil, este custo é representado por 42% do volume de vendas de parasiticidas, representando 700 milhões de dólares anuais (Vieira, 2005). O rebanho bovino brasileiro alcança 211.764 milhões de animais, compreendendo o maior rebanho do mundo. A criação de ovelhas e cabras no Brasil abrange 17.291 milhões e 8 milhões de animais respectivamente (IBGE, 2014).

Dentre as helmintíases mais prevalentes no Brasil, estão as causadas por nematoides parasitas. Os principais agentes causadores são *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) (Brasil, 2018).

1.2 Nematoides

O filo Nematoda representa um diverso conjunto de organismos que podem ser de vida livre ou parasitar plantas ou animais (Chilton, 2016). Eles são animais basicamente aquáticos, embora possam ser encontrados em quase todos os tipos de ambiente, desde que haja pelo menos um filme de água para mantê-los umedecidos. Neste filo há cerca de 80.000 espécies de nematoides já descritas. Em sua grande maioria, são organismos microscópicos, não visíveis a olho nu, medindo de 0,2 a 2,0 mm de comprimento. Um pouco poucas formas, no geral, parasitam animais e são bem maiores, sendo medidas em centímetros ou, raramente, em metros (Ferraz, 2018). Eles são organismos multicelulares, pseudocelomados, que apresentam o corpo alongado, com extremidade anterior e posterior afiladas, sem segmentação e com simetria bilateral, o que confere a estes um eficiente plano de organização corporal (Roberts & Janovy, 1996).

Todos os nematoides apresentam um robusto tegumento protetor do corpo, a chamada parede do corpo, uma estrutura primordial para o sucesso e diversidade de espécies. Esta complexa matriz extracelular é um revestimento externo e é requerido para manter o formato corporal, movimento e funções, além da interface com o ambiente. Sua camada mais externa é a cutícula, que é crucial para o desenvolvimento e sobrevivência dos nematoides, sendo composta primariamente de colágeno e secretada por células da hipoderme (Page, 2014). A cutícula tem uma complexa e diversificada estrutura que é composta de três camadas, com

presença de enzimas e RNA, que demonstra que esta é uma estrutura metabolicamente ativa (Lee, 1967).

Os nematoides constituem um potencial instrumento para avaliar a qualidade de ambientes terrestres ou aquáticos, desenvolvimento de tipologia ecológica e biomonitoramento de sistemas. Neste intuito são usados para interpretação de distúrbios físicos ambientais e poluição de ambientes, baseado na mudança de diversidade, presença e alteração no padrão da população destes fatores (Bongers, 1990).

Os nematoides são ecologicamente ubíquos. Eles têm o corpo cilíndrico, vermiforme, são altamente adaptáveis e mostram habilidade para localizar, invadir e causar alterações tanto na fisiologia quanto na resposta imune do hospedeiro. Seus representantes de vida livre desempenham a função de manter os ecossistemas se alimentando de matéria morta ou microorganismos. Elementos de vida livre têm importante função em processos de decomposição nos solos, permitindo a reciclagem de nutrientes em ambientes terrestres e marinhos, podendo ser usados como organismos sentinelas no monitoramento de ambientes como indicadores de poluição (Bongers & Bongers, 1998). Contudo, a maioria dos parasitários causam grande prejuízo financeiro porque afetam a saúde humana e animal e a colheita de plantações. Vários métodos de controle para nematoides parasitas estão sendo desenvolvidos, incluindo medicamentos/químicos, agentes biológicos e plantas transgênicas (Igbal, 2017). A ampla distribuição dos nematoides em diferentes ambientes e hospedeiros, bem como as várias estratégias de sobrevivência que possuem, mostram sua importância na produção vegetal, saúde humana, saúde animal e equilíbrio de ecossistemas.

Os nematoides parasitas causam grande impacto na saúde pública humana e animal. Segundo Blaxter (2011), em um artigo de revisão, *Ascaris lumbricoides*, uma espécie que infecta mais de um bilhão de pessoas no mundo, pode causar desnutrição e obstrução intestinal. Os causadores de teníase, e os ancilostomídeos, como *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*, infectam mais de 600 milhões de pessoas no mundo. As espécies *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi* induzem doenças crônicas e incapacitantes que acometem o sistema linfático. Outras espécies de nematoides parasitas também podem afetar criações de gado e animais selvagens, como os integrantes da família Strongylidae que induzem gastroenterites e causam diversas perdas econômicas (Roeber *et al.*, 2013). Apesar destes prejuízos, os mecanismos de infecção e resistência de nematoides à fármacos são pouco estudados e as doenças causadas por eles são consideradas negligenciadas por estarem associadas às condições de pobreza e desigualdade socioeconômica. Avanços importantes, contudo, têm sido alcançados estudando a fisiologia de parasitas de vida livre, como o *Caenorhabditis elegans*.

1.3 *Caenorhabditis elegans*

O nematoide *Caenorhabditis elegans* foi descrito pela primeira vez por Maupas (1901), porém apenas se destacou 74 anos depois quando Sydney Brenner, em Cambridge, no Reino Unido, selecionou a espécie para seu programa de pesquisa em genética (Brenner, 1974). Isto se tornou um fenômeno global. Sua intenção era encontrar uma espécie fácil de manter, que tivesse uma genética traçável (o que facilitaria o isolamento de mutantes) e fácil de ser observado. Ele tem emergido como um importante modelo animal em vários campos, incluindo neurobiologia, biologia evolutiva e genética. Características desse sucesso incluem fácil manipulação genética, invariável e completo programa de desenvolvimento descrito, genoma sequenciado, manutenção fácil, ciclo de vida curto e prolífico, com tamanho aproximado de 1mm, fecundidade alta e anatomia simples. Além disso, o uso do *C. elegans* oferece várias vantagens devido aos grandes recursos de conhecimentos genéticos e técnicos relacionados à grande viabilidade de manipulação em experimentos (Antoshechkin & Sternberg, 2007).

Os nematoides parasitos são muito difíceis de serem estudados porque sua manutenção requer passagem pelo hospedeiro no seu ciclo de vida, dificultando experimentos em seu habitat natural de forma semelhante ao que acontece em seu hospedeiro habitual. Assim, *C. elegans* tem sido usado rotineiramente como um grande sistema modelo, pois exibe similaridades com os nematoides parasitos apesar de ser de vida livre. Além da morfologia, comparações genéticas são feitas, como por exemplo, o genoma e homologia entre genes específicos. O uso de *C. elegans* permite a aplicação de poderosas ferramentas moleculares e tem sido usado com sucesso no estudo da fisiologia de nematoides (Holden-dye *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que *C. elegans* é uma ferramenta útil para examinar a toxicidade de vários compostos, sem levar em conta que muitos efeitos da substância tóxica observados em mamíferos podem ser imitados neste organismo modelo, e assim seu mecanismo de ação pode ser estudado. *C. elegans* é um modelo ideal que expressa o aumento em novas, eficientes e altamente reproduzíveis abordagens para a toxicologia e seleção de vários químicos e entender sua toxicidade (Avila, 2012).

O conhecimento acerca da fisiologia e interação de fungos e bactérias com *C. elegans* é vasto, por isso ele foi selecionado como modelo animal para desenvolvimento de novos fármacos anti-helmínticos. Além disso, ele permite uma seleção *in vitro* de componentes com propriedades anti-helmínticas promissoras, promovendo a descoberta de novos compostos que

estão relacionados a processos infecciosos que somente se manifestam durante o curso da infecção (Kong *et al.*, 2016).

1.3.1 Morfologia e Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*

Similar a outros nematoides, *C. elegans* tem um corpo não segmentado, cilíndrico e pontudo na parte final. O revestimento corporal é constituído pelas camadas da parede do corpo, sendo estas: cutícula, hipoderme e camada muscular enquanto que internamente são observados faringe, intestino e no adulto, as gônadas (Fig. 3). *Caenorhabditis elegans* possui dois sexos, um auto-fertilizante hermafrodita (XX) e o macho (XO) (Altun, 2005).

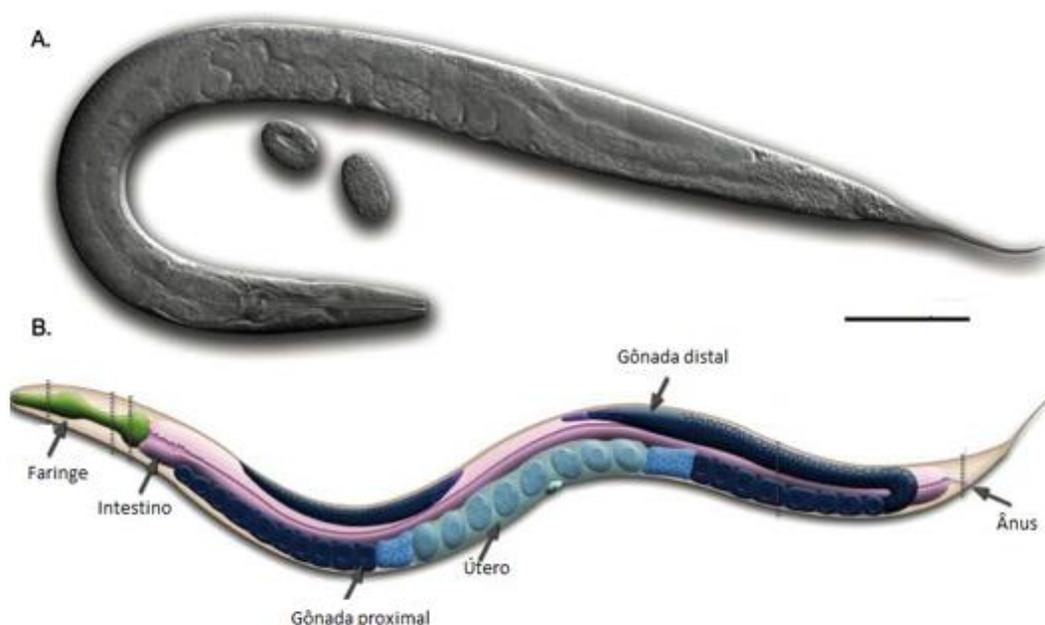


Figura 3 - Morfologia de um adulto hermafrodita. A- Microscopia óptica de um adulto hermafrodita, lado esquerdo lateral. Escala 0,1mm. B. Desenho esquemático mostrando as principais estruturas internas (Altun, 2005).

O ciclo de vida de *C. elegans* (Fig. 4) abrange estágio embrionário, quatro estágios larvais (L1-L4) e maturidade. O fim de cada estágio é marcado por uma mudança onde uma cutícula nova, específica para cada estágio é sintetizada (Cassada & Russell, 1975). A muda é realizada em três passos. Sendo estes: separação da cutícula velha da hipoderme; formação da nova cutícula que surge a partir da hipoderme; muda da nova cutícula (ecdise). A síntese das proteínas que constituem a cutícula é alta durante a muda e reduzida no período entre as mudas.

Além disso, a ultraestrutura da cutícula e a composição proteica difere em cada muda. Pouco antes da apólise (separação da cutícula da hipoderme), o movimento faringeal cessa e o nematoide entra em estágio de letargia.

A letargia é dividida em duas fases: na primeira, a locomoção é cessada e a cutícula se torna afrouxada nos lábios, na cavidade bucal e em volta da cauda. Isso é seguido da segunda fase de letargia, quando a larva começa a se movimentar em torno do seu eixo longitudinal, perdendo a velha cutícula adicional. Por volta de 30 minutos antes da ecdise o bulbo terminal da faringe começa a contrair-se espasmodicamente, largos grânulos se acumulam na glândula faringeal e o corpo começa a se mover. Subsequentemente o alinhamento cuticular da faringe se quebra na direção do intestino na região posterior e na boca na região anterior. A larva empurra a velha cutícula e através de uma abertura feita na região da cabeça. A larva começa então a se alimentar imediatamente (Stein *et al.*, 2001).

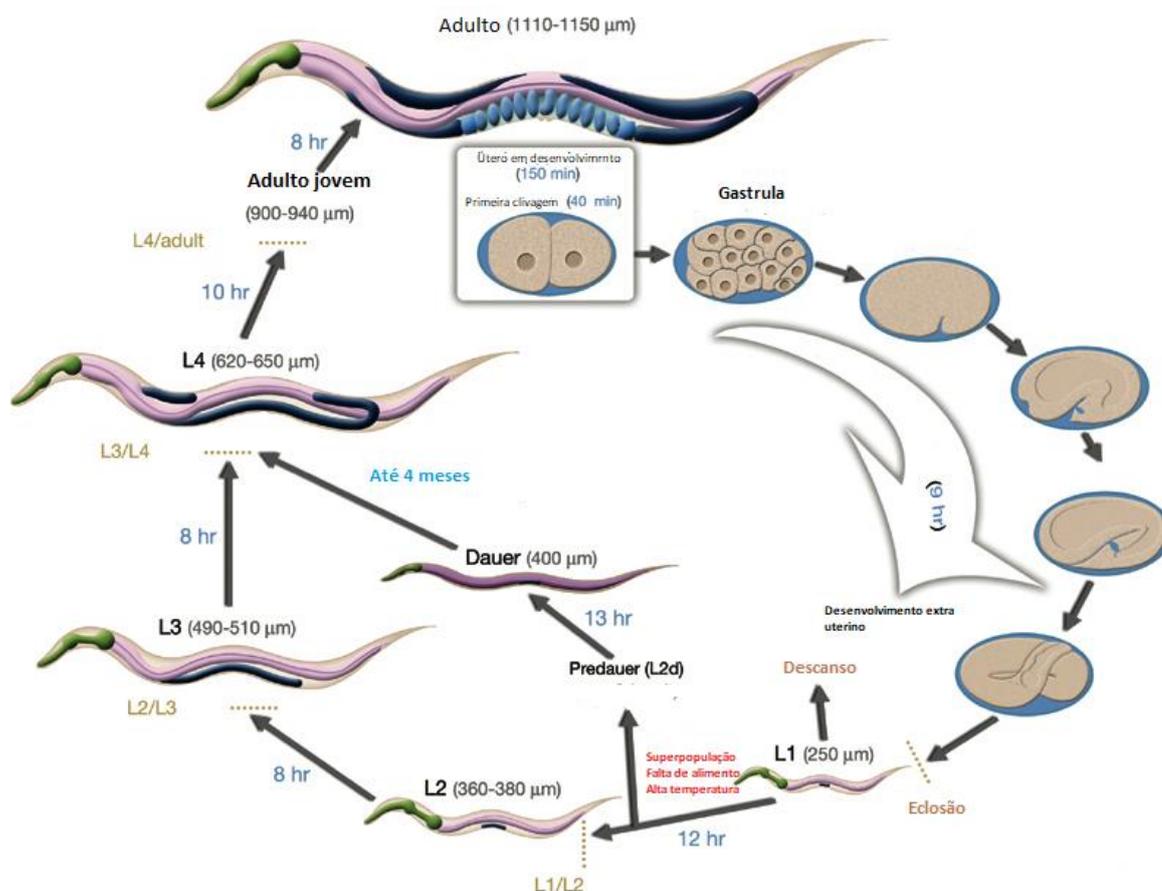


Figura 4 - Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* (Altun, 2005).

1.3.2 A Larva “Dauer”

Os organismos que se encontram em ambientes com condições desfavoráveis podem desenvolver várias estratégias de sobrevivência, que podem envolver vários estágios. Alguns deles, inclusive os nematoides, sobrevivem em condições desfavoráveis passando por um estágio de diapausa no desenvolvimento. Este é o caso do *Caenorhabditis elegans*. Isto pode ocorrer na falta de comida, alta densidade populacional, que são indicados pela concentração de feromônios. Estas respostas afetam o tempo de reprodução dos nematoides e dão uma percepção em relação ao ambiente, sugerindo que diferentes combinações de condições a que estão expostos podem provocar uma diversidade de respostas fenotípicas vistas em *C. elegans* (Diaz *et al.*, 2015).

A “Dauer” é um estágio larval de *C. elegans* e é um exemplo de diapausa facultativa. Fatores ambientais agem como sinais para um desenvolvimento do estágio larval L1, resultando em alterações fisiológicas e desenvolvimento que levam à formação de um terceiro estágio larval especializado em dispersão e sobrevivência a longo prazo. A larva “Dauer” é capaz de movimento ativo, mas ela não se alimenta. Ela possui uma morfologia única e é resistente ao estresse, têm um metabolismo energético alterado e o desenvolvimento é contido, assim como seu envelhecimento. Ela sobrevive 4 a 8 vezes mais do que os que não passaram por este estágio para completar seu ciclo (Riddle, 1997).

A larva “Dauer” é considerada como “não envelhecível”, porque a duração do seu estágio não afeta o ciclo após este estágio (Klass *et al.*, 1976). O consumo de seu estoque de energia pode ser o maior fator limitante para a duração deste estágio (Riddle, 1997).

Várias formas de diapausa são comuns entre os nematoides e elas podem se tornar interessantes paralelos entre a larva “Dauer” de *C. elegans* e formas que possuem seu desenvolvimento detido que têm sido documentadas como estágios obrigatórios no ciclo de vida de um grande número de espécies parasitas (Evans *et al.*, 1976). Em muitos casos, este estágio restrito são formas difundidas especializadas para sobreviver em períodos entre infecções (Riddle *et al.*, 1985).

A larva “Dauer” exibe um comportamento não observado nos outros estágios. O movimento bulbo-faríngeo está completamente suprimido e a larva frequentemente se mantém parada. Apesar da letargia, ela se mostra responsiva ao toque, respondendo rapidamente ao estímulo. Ela também tende a rastejar por cima de objetos que se projetam no substrato, repousa sob sua cauda e move sua cabeça para frente e para trás. Em seu ambiente natural, este

comportamento é chamado de nictação. E pode permitir a fixação em insetos que possam estar passando, permitindo que a larva seja carregada para novos locais (Riddle, 1997).

1.3.3 Parede do corpo e cutícula

A parede do corpo dos nematoides é revestida por uma cutícula, que além de ser uma camada de proteção, é um exoesqueleto importante na manutenção e definição da forma deste nematoide e mantém o equilíbrio entre a flexibilidade e a rigidez que permite o movimento do animal. A cutícula é uma matriz extracelular consistente, predominantemente de colágeno. Ainda que contenha outras proteínas e compostos não proteicos que indubitavelmente realizam uma parte significativa de sua função, o colágeno desempenha um papel específico na estrutura e morfologia da cutícula. O genoma de *C. elegans* contém entre 50 e 150 genes de colágeno (Johnstone, 1994).

A cutícula dos nematoides é crucial para seu desenvolvimento e sobrevivência, e é responsável pelo sucesso e diversidade do grupo. Esta estrutura é composta primariamente por colágeno que é secretado por células presentes na hipoderme, uma camada subjacente a esta. Muitos estudos usando *C. elegans* demonstram que a formação da cutícula requer atividade de várias enzimas, que são requeridas para pré-secreção, para a síntese de proteínas do colágeno e pós secreção, para a muda no desenvolvimento da nova cutícula, num processo conhecido como muda (Page *et al.*, 2014).

A cutícula que circunda o corpo principal do animal pode ser subdividida nas regiões dorsais e ventrais que se sobrepõem à hipoderme e às regiões laterais estreitas que cobrem os cordões hipodermis onde os nervos longitudinais denominados linhas laterais estão posicionados na cutícula (Johnstone, 2000). A linha lateral se difere do restante da cutícula em composição proteica e ultraestrutura (Page e Johnstone, 2007).

A cutícula dorsal e ventral tem uma grossa ultraestrutura de multicamadas, que variam nos diferentes estágios de desenvolvimento (Peixoto *et al.*, 1997). Há quatro camadas principais (epicutícula, cortical, media e basal) que podem ser subdivididas. A superfície cuticular é adornada em todos os estágios evolutivos com estriações cuticulares transversais (Sapio *et al.*, 2005).

Uma nova cutícula é gerada em cada estágio de desenvolvimento, sendo sintetizada cinco vezes durante o ciclo de vida deste nematoide, com a síntese da primeira cutícula começando durante a embriogênese. Para que seja alcançado seu desenvolvimento, a cutícula

antiga é vertida e reposta por uma nova em um processo conhecido como muda. A importância da cutícula é manter a forma corporal, e alterações nela podem resultar em drásticas alterações corporais e morte (Kramer, 1994).

Durante a síntese da cutícula, filamentos submembranosos de actina se formam dentro das células da hipoderme e são organizados circunferencialmente ao redor do corpo cilíndrico deste nematoide, coincidindo com os sulcos que formam a superfície apical das células membranosas da hipoderme e subsequentemente com os sulcos que delineiam os limites das estriações da superfície da cutícula polimerizada (Fig. 5) (Costa *et al.*, 1997). É provável que o padrão de filamentos de actina tenha um papel definitivo em estabelecer o padrão de estriação na superfície da cutícula (Page e Johnstone, 2007).

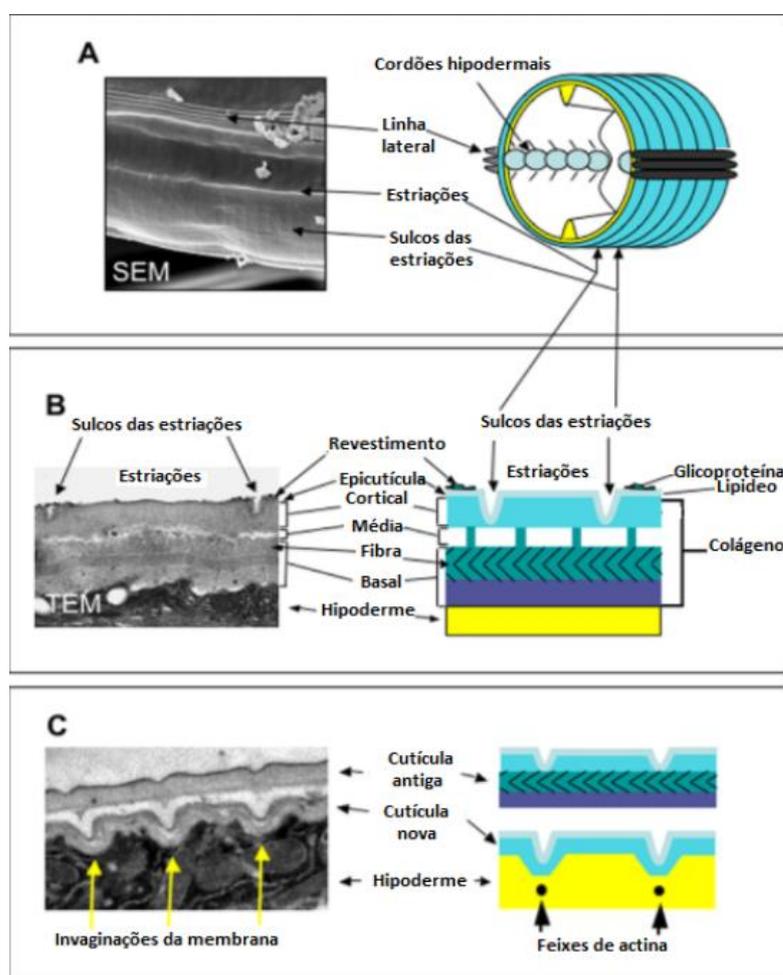


Figura 5- Organização e estrutura da cutícula de *Caenorhabditis elegans*. A- Microscopia eletrônica de varredura da superfície de um adulto, acompanhada de uma representação esquemática. B- Micrografia de transmissão retratando uma secção longitudinal da cutícula do adulto destacando a estrutura distinta das camadas e sua composição. Com exceção da epicutícula e da superfície, o colágeno está presente na maioria das camadas. C- retrata a síntese de uma nova cutícula e ao destacamento da cutícula antiga. O padrão de estriação da camada externa da cutícula é estabelecido por invaginações na superfície da membrana hipodérmica, e é restrito à camada externa da cutícula. Adaptado de Page *et al.*, 2007.

1.4 Tratamento das helmintíases

As infecções por nematoides parasitos apresentam uma ameaça significativa na medicina humana e veterinária. Elas não somente causam problemas de saúde como resultam em grandes perdas econômicas na criação de animais. Fármacos anti-helmínticos são o principal suporte de controle de nematoides (Abongwa *et al.*, 2016). Uma das vantagens terapêuticas mais importantes é a grande habilidade na redução da morbidade causada pela infecção (Arfaa, 1984).

Os fármacos disponíveis para o tratamento das helmintíases incluem Albendazol, Tiabendazol, Niridazol, Dietilcarbamazina, Ivermectina e Praziquantel (Tabela 1) e eles podem apresentar sérios efeitos colaterais tais como hepatotoxicidade, perda de apetite, náusea, vômito, dor abdominal, dor de cabeça e diarreia. Faz-se necessária a busca por novos fármacos com maior efeito anti-helmíntico e mínimo efeito colateral (Manke *et al.*, 2015).

Relatos de resistência a medicamentos têm sido feitos em todos os hospedeiros na pecuária relacionados aos anti-helmínticos existentes. Em algumas regiões do mundo, a prevalência de resistência a múltiplas drogas é extremamente alta em nematoides de cabras e ovelhas, ameaçando a viabilidade da criação de pequenos ruminantes. A resistência em nematoides de cavalos e gados ainda não foi atingida no mesmo nível que pequenos ruminantes, mas evidências sugerem que os problemas relacionados a ela incluem a resistência a múltiplas drogas, que também está aumentando nestes hospedeiros (Kaplan, 2004).

A resistência ocorre devido ao extensivo uso e dosagem imprópria no uso dos anti-helmínticos, que em conjunto com outros fatores têm resultado em resistência aos fármacos, causando uma séria ameaça ao tratamento e controle efetivo de infecções parasitárias. A bioquímica e os mecanismos genéticos ainda não são bem entendidos, mas parece ser complexo e varia entre diferentes espécies de helmintos (Köhler, 2001).

Diferentes áreas ecológicas no mundo desenvolvem estratégias de controle para endo e ectoparasitos que afetam os rebanhos. A maioria se mostra eficaz, mas não controlam nem previnem os danos causados pela grande resistência encontrada pelos helmintos aos antiparasitários disponíveis no mercado (anti-helmínticos, acaricidas, inseticidas). À medida que os anti-helmínticos perdem a eficácia, as estratégias de controle se tornam menos rentáveis, comprometendo a sustentabilidade do sistema produtivo (Schillhorn van Veen, 1997).

Uma vez que a resistência entre patógenos a anti-helmínticos têm se espalhado, são necessários novos componentes, com novos mecanismos de ação para minimizar o potencial de resistência aos fármacos (Melhorn *et al.*, 2011). A demanda por novos componentes terapêuticos anti-helmínticos é alta e aumenta cada vez mais.

Apesar da alta prevalência das helmintíases, a descoberta de fármacos anti-helmínticos é deficiente na indústria farmacêutica. A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento humano foram inicialmente desenvolvidos para o ramo veterinário. Assim, hoje se dispõe de um pequeno repertório de agentes quimioterápicos para tratamento das helmintíases.

Tabela 1- Fármacos registrados para tratamento de helmintíases em humanos. Adaptado de Holden-dye *et al.*, 2014.

Helmintíase	Fármacos
Esquistossomose	Oxamnaquine Praziquantel
Parasitoses intestinais	Piperazina Benzimidazol Morantel Pirantel Levamisol Avermectinas e milbemicinas Tribendimidina
Fasciolose	Triclabendazol
Filariose	Dietilcarbamazina Albendazol Ivermectina
Cestodioses	Albendazol Praziquantel Niclosamina Benzimidazol

1.4 Ivermectina

A ivermectina é uma lactona macrocíclica do grupo das avermectinas, que são classes de medicamentos mais utilizadas para tratar as infecções por nematoides de significância médica e veterinária. Ela é naturalmente produzida a partir do *Streptomyces avermectilis*, foi a primeira do grupo a ser aprovada para uso veterinário e é constantemente usada como anti-

helmíntico na produção animal (Omura & Crump, 2004). Ela possui alta atividade antiparasitária, aliada a dosagens únicas e extremamente baixas (Campbell, 1983), administradas por via oral ou injetável (Campbell, 1987). Causam a paralisia de nematoides e artrópodes susceptíveis devido à inibição do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) (Campbell, 1984).

Apesar de seu valor anti-parasítico, a ivermectina também apresenta problemas. Um dos principais danos causados ocorre através da carne e subprodutos que são consumidos pelo ser humano, e constitui um problema de saúde pública. A ivermectina tem seu uso aprovado em vacas leiteiras, mas deixa resíduos no leite por tempo prolongado e pode se encontrar acima do limite máximo permitido no leite de fêmeas lactentes, afetando assim a saúde humana (Alcaino, 1987).

Os produtores de carne utilizam a ivermectina porque têm grande eficácia contra endo e ectoparasitos e possui uma ação sistêmica de efeito prolongado, o que pode causar um impacto negativo em produtos de origem animal e no meio ambiente, através da excreção direta pelas fezes dos animais e descarte incorreto de frascos vazios do produto. Assim, insetos coprófagos, dípteros e o ecossistema de solo são prejudicados (Medina, 2012).

A ivermectina é um fármaco com mais de 20 anos de uso em humanos e se apresenta como alternativa a um fármaco de eleição na maioria das infestações cutâneas que afetam as populações da América Latina. Seu uso em humanos é feito principalmente em crianças, na forma oral e aplicação tópica. Suas indicações para endoparasitoses incluem ascaridíases, estrogiloidíases, tricuriase e enterobioses. Para ectoparasitoses é indicada para pediculoses, escabioses, miíases, larva migrans cutânea, demodicoses, dentre outros. Contudo, são necessários vários estudos para comprovar os resultados, além de ensaios clínicos para controlar sua eficácia (Victoria, 2003).

1.5 Produtos Naturais

Os produtos naturais são uma rica fonte de componentes que têm uma larga escala de aplicação na medicina, ciências médicas, farmácia e biologia (Yao *et al.*, 2016). São derivados de organismos vivos, se destacando pelas suas extraordinárias propriedades biológicas e farmacológicas de uso clínico. Os mecanismos pelos quais os compostos naturais protegem contra as diversas doenças podem oferecer grandes benefícios terapêuticos (Wang *et al.*, 2016).

A pesquisa e a produção de medicamentos produzidos a partir das plantas com atividade medicinal comprovada cientificamente envolvem várias etapas, sendo uma delas a de validação, que envolve testes que visam confirmar a sua eficácia e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos. Os testes de eficácia podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*. Estes testes servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada. Para determinação do potencial anti-helmíntico de plantas, podem ser realizados os testes de inibição de eclosão de ovos, de motilidade ou de desenvolvimento larvar de nematoides, podendo estes ser parasitos ou de vida livre, como *Caenorhabditis elegans* (Vasconcelos *et al.*, 2005).

Os produtos naturais são os pioneiros no desenvolvimento de novos fármacos. É, entretanto, menos provável que os princípios bioativos tornem-se um fármaco por si. É necessário que os projetos relacionados à química medicinal sejam iniciados somente quando o potencial, a seletividade e a especificidade dos produtos naturais candidatos sejam revelados. O Brasil tem uma enorme biodiversidade, mais poucas descobertas foram feitas. São necessárias iniciativas que circundem e unam os produtos naturais e a química para que hajam colaborações (Alberto *et al.*, 2001). O contexto social, as necessidades do mercado farmacêutico, e o reconhecimento que pesquisas com plantas medicinais usadas na medicina popular representam uma abordagem compatível com o desenvolvimento de novos fármacos levaram a um aumento do número de publicações neste campo, em virtude do reconhecimento da importância desta área de estudo por parte das instituições privadas ou governamentais (Rates, 2001).

Diversas infecções têm sido objeto de pesquisas que envolvem plantas medicinais, dentre as quais estão as nematodíases gastrintestinais associadas a perdas econômicas na produção de animais em todo o mundo (McLeod, 1995; Fox, 1997; Gasbarre *et al.*, 2001; Githigia *et al.*, 2001). Apesar da existência de diversos anti-helmínticos disponíveis comercialmente, o desenvolvimento de resistência pelos nematoides e a busca do mercado consumidor por fontes de tratamento em substituição aos produtos químicos, têm justificado diversas pesquisas que buscam plantas medicinais para o controle de infecção por nematoides gastrintestinais. Entretanto, a total aceitação de drogas derivadas de plantas e a fitoterapia na medicina científica só poderão ocorrer se estes produtos cumprirem os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade que os produtos sintéticos (Rates, 2001).

A alta prevalência da resistência aos fármacos antiparasitários surgiu em nematoides que parasitam espécies de importância econômica (Sangster *et al.*, 1999). A avaliação da capacidade anti-helmíntica de plantas é uma alternativa para solucionar este problema relacionado a de fármacos anti-helmínticos de amplo espectro usados na medicina humana e

veterinária disponíveis atualmente. Segundo Pina Vazquez (2014), o extrato de três plantas cultivadas em Portugal (*Dysphania ambrosioides*, *Persea americana* e *Psidium guajava*) e uma silvestre (*Marrubium vulgare*), mediante o uso do nematoide *C. elegans* como modelo, obteve o efeito de diminuir a capacidade de locomoção, que é uma característica esperada de um anti-helmíntico eficiente. Além deste efeito, *Psidium guajava* também inibiu a oviposição de *C. elegans*.

O potencial anti-helmíntico da maioria das plantas utilizadas como antiparasitárias na medicina é um campo aberto para exploração científica e o estudo do mecanismo de ação é importante para buscar alternativas à resistência. O nematoide *C. elegans* representa uma alternativa útil para este estudo no âmbito molecular e fisiológico, explorando a interação dos metabólitos a nível genético e molecular. A avaliação de metabólitos potencialmente anti-helmínticos procedentes de fontes naturais é uma alternativa que se investiga como solução para o problema da resistência a fármacos comercialmente disponíveis. Em conjunto, o uso do nematoide *C. elegans* para explorar o mecanismo de ação de compostos de plantas com potencial anti-helmíntico é um passo a mais para ajudar a resolver o problema das parasitoses que afetam países em desenvolvimento (Piña-Vazquez, 2014).

1.6 Laurencia

As algas vermelhas (Rhodophyta) são reconhecidas como as maiores produtoras de substâncias halogenadas no meio marinho (Fenical, 1975; Teixeira, 1991). Dentre elas, o gênero *Laurencia* destaca-se como uma fonte de novos produtos naturais (Scheuer, 2013). Essas algas são amplamente distribuídas em mares temperados-quentes e tropicais do mundo (Bold & Wynne, 1985). Segundo Oliveira-Filho (1977), as algas são organismos eucarióticos que possuem clorofila e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Neste ambiente, podem fazer parte dos “bentos” (indivíduos fixos no substrato) ou “plâncton” (indivíduos suspensos na água). O ambiente marinho, principalmente nas regiões tropicais, apresenta uma diversidade de espécies comparável aquela presente nas florestas tropicais. Esta riqueza de espécies é capaz de produzir uma enorme variedade de estruturas químicas com um potencial elevado para descoberta de novos fármacos (Molinski *et al.*, 2009).

Algas do gênero *Laurencia* são encontradas em mares subtropicais e tropicais de todo mundo, abrangendo cerca de 150 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de trinta espécies sendo três delas consideradas endêmicas: *L. catarinenses*, *L. oliveirana* e *L. translucida*. Os estudos sobre os constituintes químicos de *Laurencia* tiveram início em 1953, quando foi verificado que o óleo essencial de *L. glandulifera* apresentava sesquiterpenos como componentes majoritários. A partir de 1965, iniciaram estudos clássicos de isolamento, purificação e elucidação estrutural de diferentes substâncias de *Laurencia*. Seguiram-se inúmeros outros trabalhos que resultaram, em última análise, no fato de *Laurencia* ser o gênero de alga marinha mais estudado até o momento (Pereira *et al.*, 1999).

As algas vermelhas do gênero *Laurencia* são conhecidas como uma riquíssima fonte de metabólitos secundários. As principais classes químicas já isoladas são terpenos sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos - e acetogeninas. Estudos apontam que estas substâncias apresentam importantes atividades biológicas, principalmente citotóxica e antibacteriana. Existem ainda alguns poucos trabalhos com informações sobre atividade antiparasitária, antiviral e antifúngica dos metabólitos de *Laurencia*. O forte perfil bioativo observado em alguns estudos sugere que alguns destes metabólitos podem ser futuramente utilizados como fármacos ou como protótipos de novos agentes antitumorais e antibacterianos. Muitos dos metabólitos de *Laurencia* ainda não foram avaliados sob o ponto de vista farmacológico, o que representa um grande potencial a ser explorado por diversos campos da farmacologia (Machado *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Machado *et al.* (2008) mostram que os metabólitos de *Laurencia* podem apresentar múltiplas funções, como proteção contra herbívoros e organismos incrustantes, aumentando a capacidade adaptativa do indivíduo ao ambiente. A mediação destes metabólitos em interações entre organismos pode indicar que estas moléculas também atuem em outros sistemas biológicos. Desta observação parte a motivação para a busca de moléculas de interesse terapêutico, uma vez que estudos têm verificado diferentes ações farmacológicas de metabólitos de algas do gênero *Laurencia*.

Laurencia dendroidea é amplamente distribuída na região costeira do Brasil. Em um estudo fitoquímico realizado por Machado *et al.* (2016), foram coletadas amostras desta alga em seis locais diferentes de dois estados da costa brasileira (Rio de Janeiro e Espírito Santo) (Tabela 2) e revelaram a alta diversidade da composição de sesquiterpenos na população de *L. dendroidea* coletada naquele período. Curiosamente, a variedade na composição de elatol e obtusol entre as populações de *L. dendroidea* sugere uma interação no conteúdo destes compostos, onde pode ser observado que o extrato AZE, obtido da praia Azeda, apresenta o

metabólito elatol como majoritário (Tabela 3). Há necessidade de mais estudos para entender os padrões de distribuição química e compostos entre as populações.

Tabela 2- Locais de coleta das amostras estudadas. Adaptado de Machado *et al.*, 2016.

Código	Local de coleta	Localização	Data da coleta
MAN	Praia Manguinhos-Serra- Espírito Santo (ES)	20°11013.9"S, 040°11025.4"O	Março,2010
MEA	Praia Meaípe-Guarapari-Espírito santo (ES)	20°11018.0"S, 040°11025.2"O	Março,2010
AZE	Praia Azeda-Búzios-Rio de Janeiro (RJ)	22°44033.6"S, 41°52055.6" O	Março,2011
VER	Praia Vermelha-Parati-Rio de Janeiro (RJ)	23°11035.0" S, 044°38039.0"O	Abril,2011
BIS	Enseada Biscaia-Angra dos reis-Rio de Janeiro (RJ)	23°01033.7" S, 044°14008.1"O	Abril,2011
FOR	Praia do Forno-Araial do Cabo-Rio de Janeiro (RJ)	22°58003.3" S, 42°00056.2" O	Mai,2011

Tabela 3- Conteúdo relativo de sesquiterpenos expressos em porcentagem de compostos obtidos por análise de extratos de diferentes populações. Valores são o significado \pm desvio padrão, n=15. Adaptado de Machado *et al.*, 2016.

Composto	População					
	Manguinhos	Meaípe	Forno	Vermelha	Biscaia	Azeda
Triquinane (1)	1.27 \pm 0.04	15.41 \pm 1.33	18.52 \pm 0.79	19.08 \pm 0.68	23.95 \pm 0.27	6.18 \pm 0.17
10-Bromo-chamigra-3,7(14)-diene-9-ol (2)	2.75 \pm 0.88	ND ^{a)}	0.80 \pm 0.12	ND	ND	ND
Dendroidiol (4)	8.58 \pm 0.35	ND	11.13 \pm 0.34	ND	ND	ND
Nidificene (5)	1.32 \pm 0.58	2.68 \pm 0.05	ND	ND	ND	ND
Obtusane (6)	0.97 \pm 0.07	ND	3.72 \pm 0.42	0.38 \pm 0.02	1.39 \pm 0.12	ND
Cartilagineol (7)	3.28 \pm 0.20	5.09 \pm 0.46	0.33 \pm 0.03	ND	ND	ND
Rogiolol (8)	11.97 \pm 0.78	25.88 \pm 2.89	ND	ND	ND	ND
Obtusol (9)	23.74 \pm 1.78	1.70 \pm 0.13	18.71 \pm 0.83	0.37 \pm 0.01	11.80 \pm 0.31	ND
Isoobtusol (12)	ND	3.45 \pm 0.35	0.07 \pm 0.01	ND	ND	0.72 \pm 0.02
Elatol (13)	ND	ND	ND	23.15 \pm 0.82	25.37 \pm 0.16	51.57 \pm 2.17
Dendroidone (14)	ND	ND	ND	ND	1.50 \pm 0.11	ND
Debromo-elatol (15)	ND	ND	ND	6.57 \pm 0.46	ND	ND
Total de sesquiterpenos identificados	8	6	7	5	5	3

^{a)} ND = Não detectados

A variabilidade na produção de metabólitos secundários em algas marinhas é medida em condições naturais e normalmente é causada por fatores ambientais. Entretanto, não é conhecido se os níveis de metabólitos secundários podem variar também devido à regulação interna ou processos fisiológicos. Foram medidos os níveis de elatol, um composto defensivo majoritário de *L. dendroidea*, em correlação à atividade de fotossistema II (Φ_{PSII}) em clones desta alga cultivada sob condições constantes de temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e radiação. O Φ_{PSII} durante a fase de luz foi medido pela imagiologia de imunofluorescência de clorofila, que foi maior quando a concentração de elatol estava baixa. Os resultados mostraram variação temporal em quantidades de elatol, que atingiu seu nível

máximo no início dos períodos luminosos e escuros. Foi concluído que sob condições constantes, isto é, sem influência do habitat natural e variação genética, a variação da produção de elatol é inversamente correlacionada a Φ_{PSII} . Ambas atividades metabólicas de produção de metabólitos secundários e atividade fotossintética estão sob controle endógeno nesta alga vermelha. Há possibilidade de resposta adaptativa neste fenômeno por pressão ambiental (Kokkotou, 2014).

Em um estudo feito por Al-Enazi (2017), descrevendo a atividade antimicrobiana, antioxidante e anticolinesterase *in vitro* de extrato orgânico de 14 algas coletadas na costa brasileira, revelou que o resultado mais promissor antimicrobiano obtido foi através do uso dos extratos da alga vermelha *L. dendroidea* (Bianco *et al.*, 2015). A atividade antimicrobiana, antioxidante e anticâncer de extratos de *L. catarinensis*, *L. majuscula* e *Padina pavonica* foram determinados em um estudo feito com estas três espécies, revelando a maior atividade antibacteriana em *Klebsiella pneumonia* por *L. catarinenses* e *Padina pavonica*. Acetogeninas isoladas da alga vermelha *L. obtusa* induzem apoptose de neutrófilos periféricos no sangue, sendo candidatas promissoras para desenvolvimento de anti-inflamatórios (Bawakid, 2017).

A esquistossomose pode ser causada por seis diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. O tratamento é baseado em dois fármacos: oxamniquine, que é eficaz em *Schistosoma mansoni*, e praziquantel, que é eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*, mas não é efetivo contra as formas jovens do parasito. Desta forma, pesquisas com novos fármacos e suas metas de tratamento da doença são urgentemente necessárias. Em um estudo feito para testar a eficácia dos extratos de algas vermelhas contra *S. mansoni*, que foi incubado em pares com diferentes concentrações dos extratos da alga, avaliou mortalidade, redução da mobilidade e distanciamento do par de helmintos adultos. Os extratos de 13 diferentes espécies de algas vermelhas foram testados no primeiro ensaio e a atividade destes foi testada em baixas concentrações. Neste estudo, os extratos de várias espécies de *Laurencia* mostraram alta atividade contra *S. mansoni* em baixas concentrações (Stein *et al.*, 2015).

Apesar do grande número de metabólitos já isolados para o gênero *Laurencia*, a grande maioria ainda não foi submetida a ensaios de atividade farmacológica, especialmente anti-helmíntica. Das 145 espécies descritas até o momento, apenas são encontrados estudos de atividade biológica para os metabólitos isolados de pelo menos quinze delas, o que corresponde a aproximadamente 10% do total. Os resultados já observados, aliados à diversidade de metabólitos disponíveis, indicam claramente que a pesquisa de metabólitos produzidos pelo gênero *Laurencia*, amplamente distribuído no nosso litoral, possui um grande potencial de

obtenção de novos protótipos de fármacos a serem utilizados no tratamento de diversas patologias (Machado *et al.*, 2010).

1.6.1 Elatol

O elatol é um sesquiterpeno isolado da alga do gênero *Laurencia*, e foi isolado de *Laurencia elata* pela primeira vez por Sims *et al.* (1974). Várias espécies de *Laurencia* produzem este metabólito como majoritário (Konig *et al.*, 1997). Muitos estudos mostram que o elatol desempenha uma importante função em interações ecológicas, tais como anti-herbivoria, atividade e potencial de defesa contra infecções por microrganismos (Sims *et al.*, 1974). Dentre as propriedades farmacológicas do elatol, destaca-se antitumoral, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral e antibacteriana (Ventura *et al.*, 2015).

O elatol é um potente agente antiproliferativo de promastigotas e formas intracelulares de amastigotas de *Leishmania* sp., e apresenta elevado potencial no desenvolvimento de novos quimioterápicos anti-*Leishmania* (Santos *et al.*, 2010).

Testes *in vitro* constataram a atividade anti-*Trypanosoma* do sesquiterpeno elatol, obtido de algas vermelhas *Laurencia dendroidea*. Através da microscopia eletrônica o efeito do elatol na morfologia e ultraestrutura do parasito foi avaliado, mostrando este ser dose dependente contra epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Observações ao microscópio óptico em formas amastigotas intracelulares tratadas demonstraram uma total eliminação da infecção na dose de 3,0 μM , sem afetar células sanguíneas vermelhas (Veiga-Santos *et al.*, 2010).

Numerosos trabalhos têm demonstrado que a atividade anticâncer de macromoléculas biológicas não tóxicas são maiores que alguns fármacos quimioterápicos convencionais. Algas marinhas são fontes significantes de substâncias bioativas naturais com tendência de emersão para o isolamento e identificação de compostos e constituintes da alga, como o elatol. Estudos confirmaram sua atividade antitumoral, reduzindo o crescimento tumoral em camundongos (Sharif *et al.*, 1974).

De acordo com Kamada *et al.* (2017), nove compostos sesquiterpenos halogenados podem ser isolados da alga vermelha *Laurencia majuscula*, dentre eles o elatol, que apresentou atividade antibacteriana contra três bactérias causadoras de doenças em humanos, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Vibrio cholera*.

A dengue é considerada um sério problema de saúde pública, sem alternativas viáveis para controlar o inseto vetor *Aedes aegypti* Linnaeus. Compostos bioativos presentes no extrato

bruto extraídos da alga vermelha *L. dendroidea* contendo elatol e obtusol se mostram também promissores como agentes pesticidas, pois são capazes de promover mortalidade nas larvas do vetor (Salvador-Neto, 2016). O elatol obtido do extrato bruto de *L. dendroidea* exibiu moderada toxicidade e alto grau de atividade repelente contra *Tetranychus urticae* (ácaro) em estudos feitos em laboratório, mostrando-se novamente como um composto promissor para o desenvolvimento de novos pesticidas (Born *et al.*, 2012).

2 Objetivos

- Avaliar o potencial anti-helmíntico do extrato bruto e do metabólito elatol, obtidos da alga *Laurencia dendroidea* no modelo experimental *Caenorhabditis elegans*;
- Avaliar o efeito de extrato bruto e do metabólito elatol de *Laurencia dendroidea* em diferentes concentrações na sobrevivência de helmintos adultos e eclosão de larvas L1 de *Caenorhabditis elegans*;
- Investigar alterações morfológicas e estruturais promovidas pelo extrato bruto e pelo metabólito elatol de *Laurencia dendroidea* em helmintos adultos *Caenorhabditis elegans* através da microscopia óptica.
- Avaliar a capacidade dos *C. elegans* em distinguir compostos patogênicos, de acordo com sua preferência olfativa através do Teste de Escolha Binária

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultivo e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para o cultivo do *C. elegans*, a bactéria *Escherichia coli* cepa OP50 foi utilizada como fonte alimentar e mantida em meio L-Broth. A cepa N2 de *C. elegans* foi mantida em placas de cultivo contendo meio NG (3g/L de NaCl; 17 g/L de ágar; 2,5 g/L de peptona; 1 mM CaCl₂; 5 mg/L de colesterol em etanol; 1 mM MgSO₄ e 25 mM KPO₄) e com a bactéria a 22°C. Foram feitos repiques a cada 7 dias para garantir a sobrevivência dos helmintos.

Em casos ocasionais de problemas de contaminação, estes são superados facilmente devido à resistência dos ovos ao tratamento com hipoclorito de sódio (4 a 6%). Pode ser estocado em nitrogênio líquido e também ser refrigerado, o que pode ser válido para períodos entre estudos.

3.2 Avaliação da atividade de ivermectina, do extrato bruto de *Laurencia dendroidea* e o metabólito elatol em formas adultas de *Caenorhabditis elegans*

As análises foram realizadas com ivermectina, com o extrato bruto da alga *Laurencia dendroidea* e com seus metabólitos. O extrato e os metabólitos foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dra. Angélica Ribeiro Soares (Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA), NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus Macaé-RJ). O extrato foi obtido por meio de uma extração ácido-base do extrato bruto em CH₂Cl₂ e as suas frações foram obtidas a partir do extrato AZE, obtido da coleta na praia Azeda, que possui o metabólito elatol como majoritário principal.

Para a realização dos experimentos, foi necessária a realização da sincronização da cultura para a obtenção dos ovos de *C. elegans*. A placa de cultivo foi lavada com água destilada ou meio M9 (3 g de KH₂PO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 5 g de NaCl, 1 ml de MgSO₄ 1 M e 1L de H₂O) para a coleta dos helmintos da placa, em seguida, adicionada uma solução constituída de 0,5 ml de NaOH 5M e 1ml de hipoclorito 6% para que ocorresse a destruição dos adultos e larvas mantendo-se apenas os ovos preservados.

O lavado com a solução foi centrifugado a 800 x g por 60 segundos para que houvesse a sedimentação dos ovos. Após a centrifugação foram realizadas lavagens repetidas em meio M9 para retirada dos resquícios da solução e, por fim, os ovos colocados em uma placa de

cultivo contendo a fonte alimentar *E. coli* e incubados por 72 h para obtenção dos adultos. Para incubação dos adultos, três dias após a lavagem, os *C. elegans* adultos foram separados em grupos com cerca de 30 helmintos, que foram incubados em uma placa de 96 poços contendo meio S.medium [meio S.basal (5,85 g de NaCl, 1 g de K₂HPO₄, 6 g de KH₂PO₄, 5mg/ml de colesterol em etanol e 1L de H₂O), 10 mL de citrato de potássio 1 M, pH 6,0, 3 ml de CaCl₂ a 1 M, 3 ml de MgSO₄] durante 3 dias com a adição do extrato de *Laurencia dendroidea*, elatol ou ivermectina, em diferentes concentrações na temperatura de 22°C. A bactéria *E. coli* foi adicionada ao meio de incubação como fonte alimentar. A ivermectina foi utilizada como controle positivo nas seguintes concentrações: 1, 5, 10 e 20nM. O extrato AZE foi utilizado nas seguintes concentrações: 400, 500, 600, 700 e 800 ng/mL. O metabólito elatol foi utilizado nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100mM.

A condição de DMSO também foi testada, pois este é o solvente da ivermectina, extrato azeda e elatol, sendo que em cada poço de incubação, a concentração atingida foi de 0,01%.

A leitura dos resultados foi realizada em microscópio óptico invertido onde são contados os helmintos vivos e os mortos. A avaliação de sobrevivência foi feita por meio da verificação da motilidade e do movimento bulbo-faríngeo.

3.3 Avaliação da atividade de ivermectina, do extrato bruto de *Laurencia dendroidea* e o metabólito elatol na eclosão de larvas L1 a partir dos ovos de *Caenorhabditis elegans*

Os ovos obtidos utilizando a mesma metodologia citada acima foram divididos em grupos com cerca de 30 ovos, adicionados em placas contendo meio S. basal durante cerca de 15 horas com a adição do extrato de *Laurencia dendroidea*, elatol ou ivermectina nas mesmas concentrações utilizadas para os adultos ou a concentração do IC₅₀ obtido nos adultos a temperatura de 22°C. A bactéria *E. coli* foi adicionada ao meio de incubação como fonte alimentar. Após este período, as larvas L1 que eclodiram foram contadas em cada condição experimental. Os resultados foram expressos em percentual de larvas L1 eclodidas.

3.4 Análises estatísticas

O percentual de sobrevivência dos adultos e eclosão das larvas L1 foram plotados em função da concentração dos compostos utilizando-se uma análise não-linear com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., EUA). As comparações estatísticas para o

percentual de sobrevivência foram realizadas por análise de variância (One-way ANOVA, Newman-Keuls pós teste) e a significância aceita se $p < 0,05$. Para o cálculo do IC_{50} , o mesmo programa foi utilizado.

O termo IC_{50} (concentração que inibe 50% da sobrevivência) é usado para avaliar a adequação e a performance de drogas, sendo um parâmetro farmacológico para comparação da potência de diferentes drogas e/ou fármacos. Os protocolos de ensaio são desenvolvidos para determinar testes em compostos que possuem propriedades desejadas (Sebaugh, 2011).

3.5 Análise morfológica do efeito da ivermectina, do extrato de *Laurencia dendroidea* e elatol em *Caenorhabditis elegans* adulto por microscopia de Luz.

Os *C. elegans* não tratados (controle), tratados com o diluente DMSO e tratados com o extrato AZE, elatol e ivermectina foram fixados em AFA (ácido acético glacial, formol 37% e álcool etílico 70%), depois lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M e transferidos com uma micropipeta para lâminas de vidro e cobertos com uma lamínula para serem observados ao microscópio Olympus BX51 equipado a câmera Olympus DP71. Esta etapa foi realizada no Laboratório Integrado de Morfologia – NUPEM – UFRJ/Campus Macaé.

3.6 Teste da escolha binária

O experimento de escolha binária visa avaliar a capacidade dos *C. elegans* em distinguir compostos patogênicos, de acordo com sua preferência olfativa. O *C. elegans* é capaz de evitar o odor do composto que ele considera mais patogênico e aumentar sua atração por odores de compostos menos patogênicos.

Este experimento foi realizado em 4 etapas, sendo elas: Treinamento, Contagem, Placa teste e Término.

No treinamento, com o auxílio de uma alça de transferência, foi semeado o extrato AZE diluído em meio L- broth líquido e *E. coli* na concentração do IC_{50} (261,2ng/mL) na metade da superfície da placa de Petri. Na outra metade da placa, foi semeado o elatol diluído em meio L- broth líquido e *E. coli* na concentração do IC_{50} (67,07mM). Foram depositados no centro da placa 51 nematoides sincronizados no estágio L1. Estes foram incubados na BOD a 22°C durante 4 horas.

Após 4hs, a placa foi lavada com 5mL de solução M9, e a solução foi adicionada em tubo Falcon. Após decantada, o volume foi ajustado para 30 μ L. Entre lâmina e lamínula, foi contado ao microscópio o número de indivíduos.

Em uma nova placa, foi semeado na forma de spot e equidistantes, o extrato AZE e o elatol. Foram semeados 51 nematoides retirados do tudo Falcon e colocados no centro da placa. Foi incubado durante 4hs na BOD a 22°C. Ao término do experimento, foi anotado o número total de nematoides em cada *spot*.

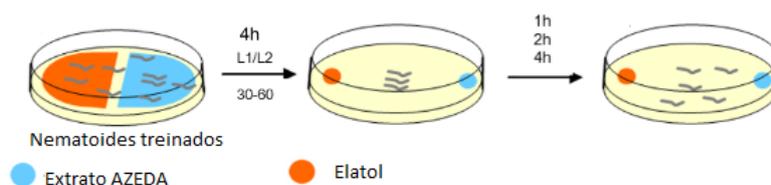


Figura 6: Esquema do ensaio de escolha binária com nematoides expostos ao extrato Azeda e ao elatol. Adaptado de Meisel e Kim, 2014.

4 Resultados

4.1 Atividade da ivermectina (IVM) na sobrevivência de adultos de *Caenorhabditis elegans*

A análise da ação da ivermectina em adultos de *C. elegans* foi plotada em gráfico que mostra o percentual de sobrevivência em função da concentração da mesma. O efeito desta na sobrevivência é claramente dependente da concentração utilizada, sendo as concentrações de 5, 10 e 20 nM as mais eficazes, levando a uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle. O IC₅₀ encontrado para a IVM foi de 0,1354 nM. A concentração de 20nM provoca 100% de mortalidade dos helmintos adultos (Fig.7).

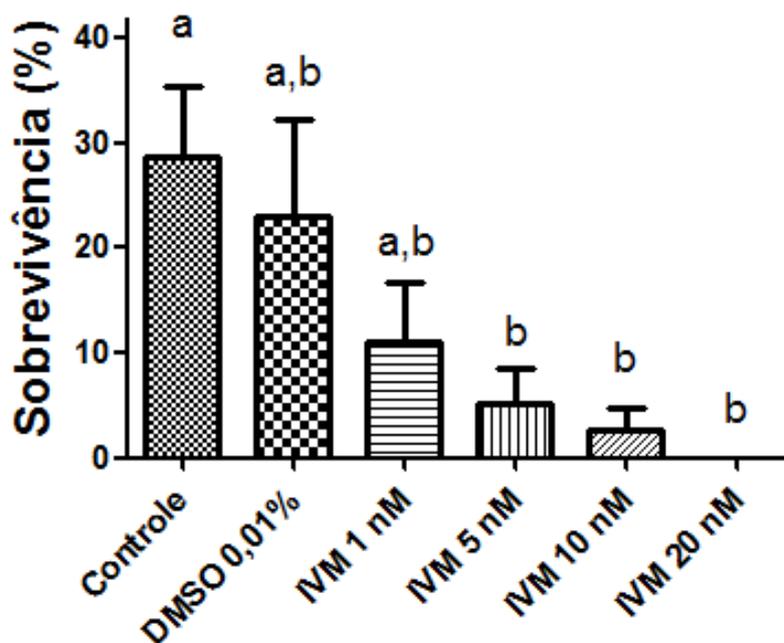


Figura 7: Percentual de sobrevivência de formas adultas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com ivermectina. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.2 Atividade do extrato bruto da alga *Laurencia dendroidea* na sobrevivência de adultos de *C. elegans*

A ação do extrato bruto AZE em adultos de *C. elegans* foi plotada em gráfico que mostra o percentual de sobrevivência em função da concentração do extrato Azeda.

O extrato bruto da alga *Laurencia dendroidea* afetou a sobrevivência de *C. elegans* adultos após três dias de tratamento. O resultado mostra a taxa de sobrevivência em função da concentração do extrato. A concentração de 800ng/ml se mostrou a mais eficaz, e o tratamento com as outras concentrações mostrou efeitos similares entre elas (Fig.8). Após três dias de tratamento, o valor do IC₅₀ encontrado foi de 261,2 ng/ml.

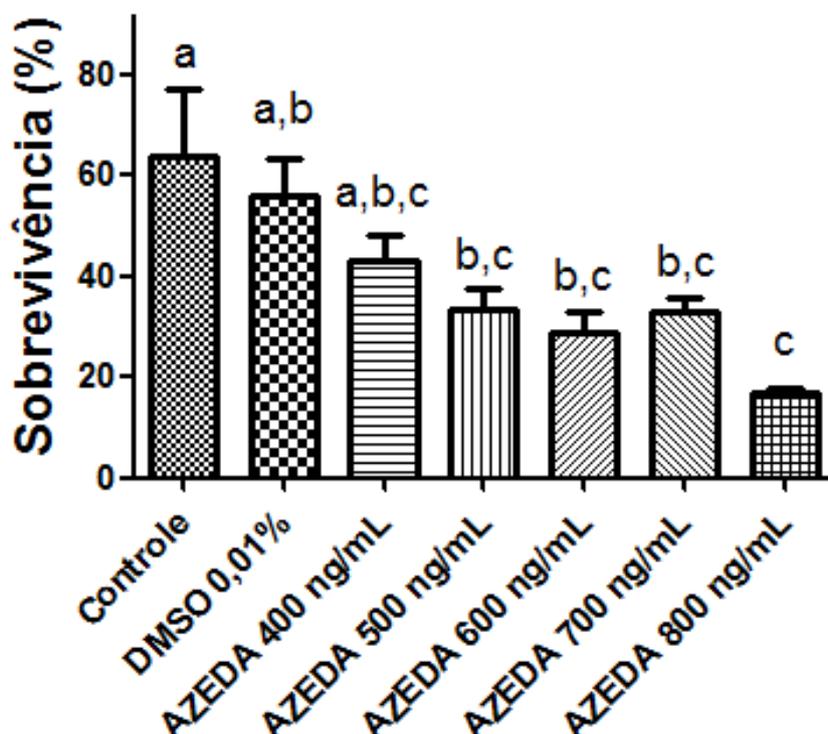


Figura 8: Percentual de sobrevivência de formas adultas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com o extrato bruto AZEDA da alga *Laurencia dendroidea*. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.3 Atividade do elatol na sobrevivência de adultos de *Caenorhabditis elegans*

A ação do elatol em adultos de *C. elegans* foi plotada em gráfico que mostra o percentual de sobrevivência em função da concentração de elatol.

O elatol afeta a sobrevivência de *C. elegans* adultos após três dias de tratamento. O resultado mostra a taxa de sobrevivência em função da concentração do elatol. A concentração de 100mM se mostrou a mais eficaz, e o tratamento com as outras concentrações se mostrou estatisticamente igual ao controle (Fig.9). Após três dias de tratamento, o valor do IC₅₀ encontrado foi de 67,07nM.

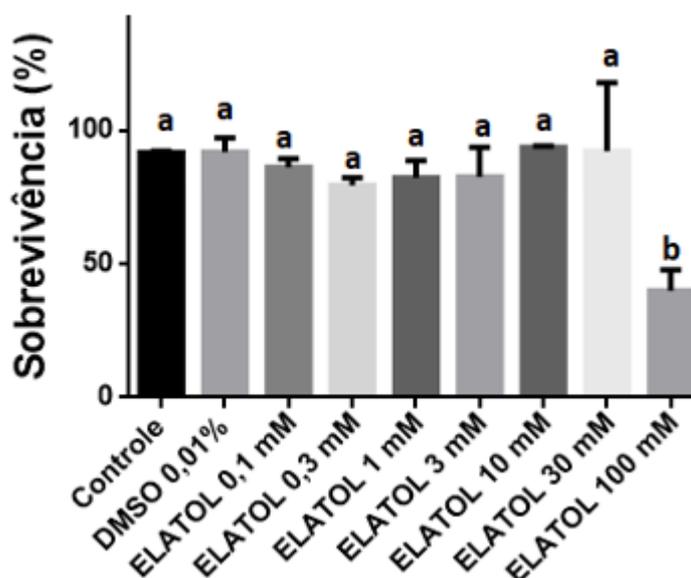


Figura 9: Percentual de sobrevivência de formas adultas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com o elatol. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.4 Efeito do extrato bruto de *Laurencia dendroidea* na eclosão de larvas L1 de *Caenorhabditis elegans*

A avaliação do efeito do extrato bruto na eclosão das larvas L1 a partir dos ovos de *C. elegans* foi plotada no gráfico que mostra o percentual de eclosão em função da concentração do extrato. O tratamento dos ovos de *C. elegans* com o extrato bruto da alga *L. dendroidea*

mostrou que este não altera a eclosão das larvas a partir dos ovos nas concentrações utilizadas, que foram as mesmas utilizadas no tratamento dos adultos (Fig.10).

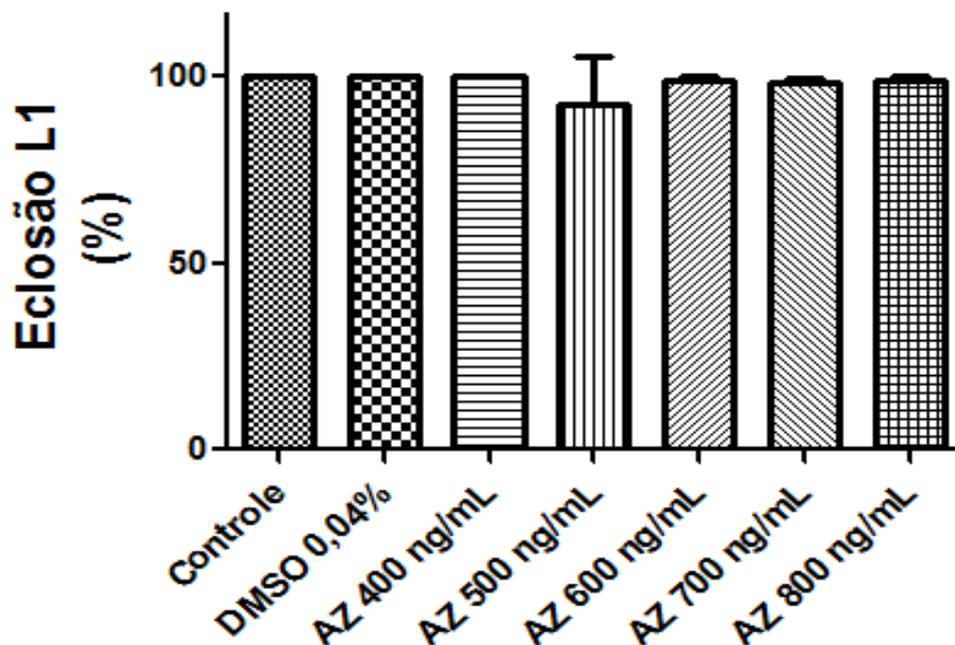


Figura 10: Percentual de eclosão de larvas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com o extrato bruto AZEDA da alga *Laurencia dendroidea*. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P > 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.5 Efeito da ivermectina na concentração do IC_{50} na eclosão de larvas de *Caenorhabditis elegans*.

A avaliação da concentração do IC_{50} da ivermectina (0,134nM) na eclosão das larvas L1 a partir dos ovos de *C. elegans* foi plotada no gráfico que mostra o percentual de eclosão em função da concentração da mesma. O tratamento dos ovos de *C. elegans* com a ivermectina mostrou que esta altera a eclosão das larvas na concentração do IC_{50} encontrada nos *C. elegans* adultos no presente estudo (Fig.11).

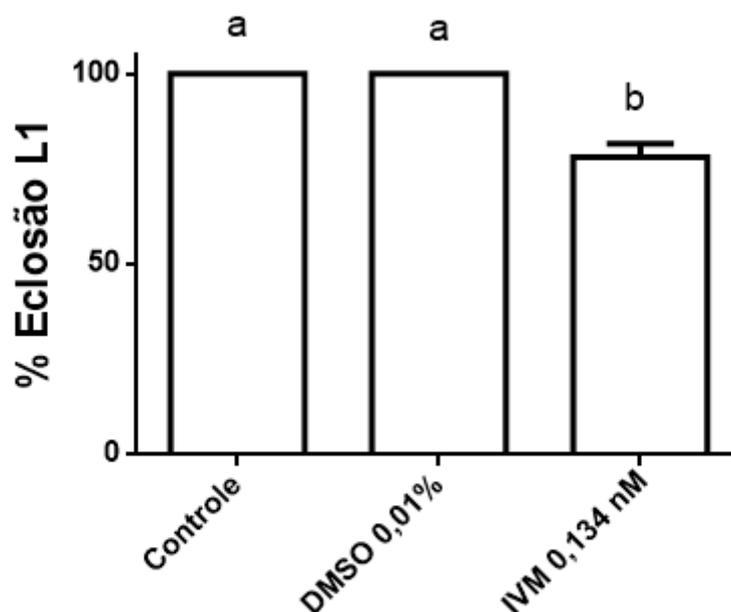


Figura 11: Percentual de eclosão de larvas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com a ivermectina na concentração do IC₅₀ de 0,134nM. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.6 Efeito do extrato azeda na concentração do IC₅₀ na eclosão de larvas L1 de *Caenorhabditis elegans*.

A avaliação do efeito do extrato bruto na concentração do IC₅₀ (261,2ng/mL) na eclosão das larvas L1 a partir dos ovos de *C. elegans* foi plotada no gráfico que mostra o percentual de eclosão em função da concentração do extrato. O tratamento dos ovos de *C. elegans* com o extrato bruto da alga *L. dendroidea* não altera a eclosão das larvas a partir dos ovos na concentração utilizada (Fig.12).

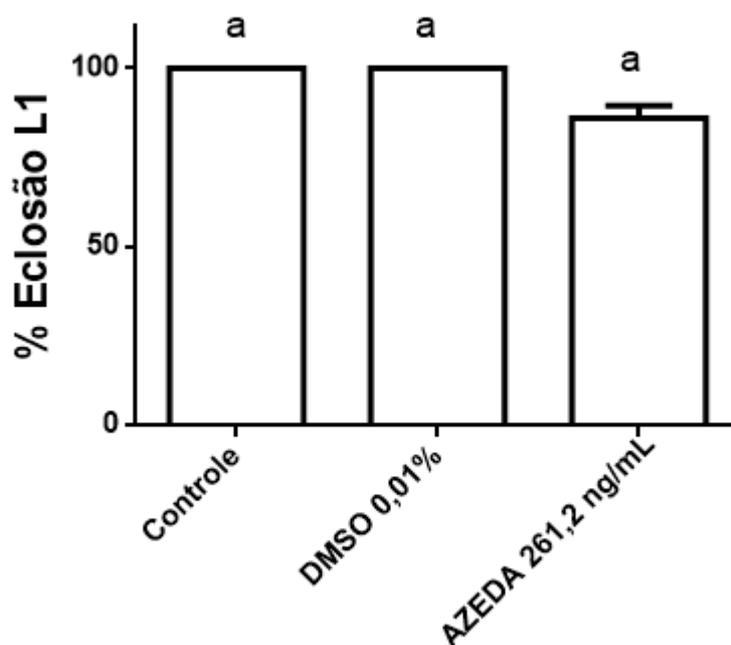


Figura 12: Percentual de eclosão de larvas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com o extrato bruto na dose do IC₅₀ de 261,2ng/mL. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.7 Efeito do elatol na concentração do IC₅₀ na eclosão de larvas L1 de *Caenorhabditis elegans*.

A avaliação do efeito do elatol na concentração do IC₅₀ (67,07mM) na eclosão das larvas L1 a partir dos ovos de *C. elegans* foi plotada no gráfico que mostra o percentual de eclosão em função da concentração do elatol. O tratamento dos ovos de *C. elegans* com o elatol não alterou a eclosão das larvas a partir dos ovos na concentração utilizada (Fig.13).

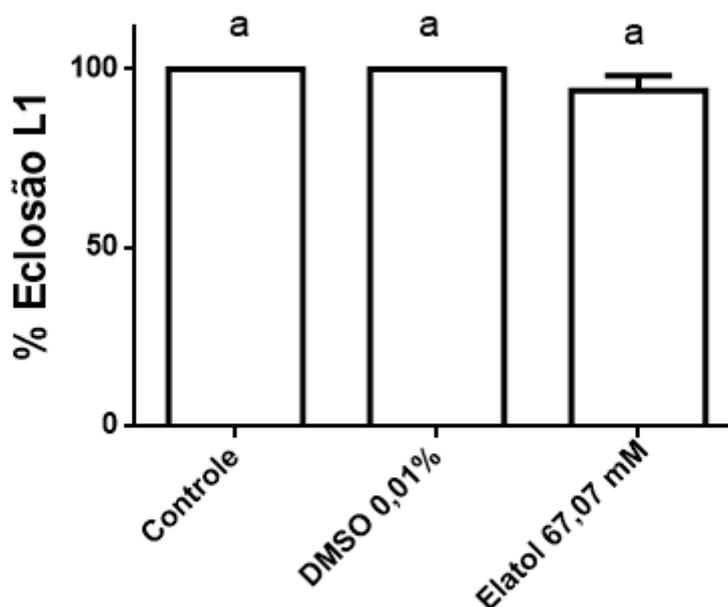


Figura 13: Percentual de eclosão de larvas de *Caenorhabditis elegans* após tratamento com o elatol na dose do IC₅₀ de 67,07mM. Os valores são a média \pm erro padrão da média de três experimentos em triplicata. As letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($P < 0,05$ One Way ANOVA, Newman-Keuls pós teste).

4.8 Análise morfológica do efeito dos compostos em *Caenorhabditis elegans* adultos através de microscopia ótica

4.8.1 Controle e controle com DMSO

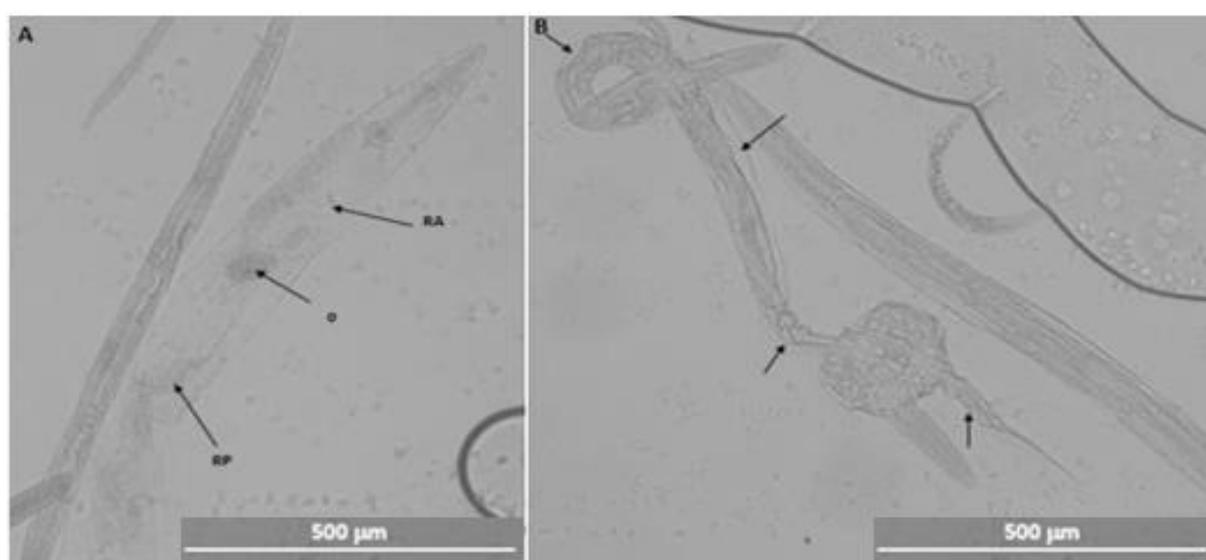
O grupo controle forneceu um padrão de referência, que permitiu avaliar se o tratamento teve um efeito morfológico através da comparação entre os grupos. Os nematoides provenientes do grupo controle e DMSO 0,01% (diluyente da ivermectina, do extrato bruto e do elatol) foram analisados e se apresentaram em sua forma intacta, sem nenhuma alteração morfológica, assim como a cutícula e as estruturas internas. A integridade da morfologia de *C. elegans* foi mantida, onde as regiões anteriores e posteriores se mostram nos padrões normais, que são afilados, sendo possível visualizar o aparelho reprodutor intacto através do útero com os ovos (Fig. 14A). Na região anterior pode-se observar estruturas internas íntegras, como faringe (Fig. 14B,C) e

bulbo esofágico (Fig. 14B), assim como a cutícula que as reveste (Fig. 14B, C). A cutícula se apresentou íntegra, revestindo todo o corpo de *C. elegans*, sem alterações (Fig. 14D).



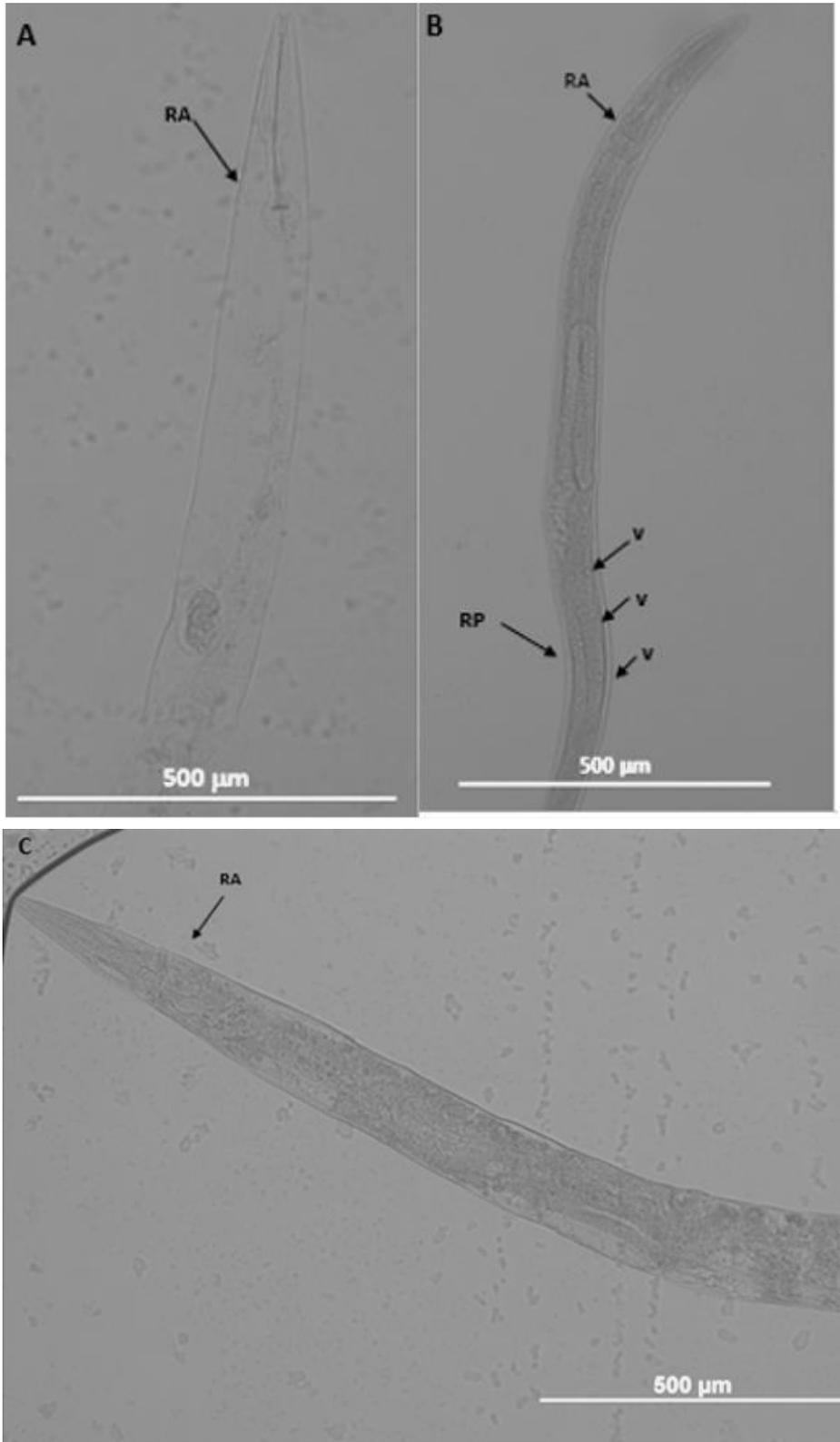
4.8.2 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com ivermectina 1nM

Neste grupo foi observado um grande desarranjo na morfologia de *C. elegans* em que um ovo está na região anterior, além de uma intensa degradação de estruturas internas (Fig. 15A). A cutícula apresenta áreas de desprendimento do corpo (Fig.15B).



4.8.3 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com ivermectina 5nM

A região anterior do nematoide apresentou severa degradação de estruturas internas uma vez que a faringe e o bulbo estão pouco delimitados e não se consegue observar o contorno do útero com ovo (Fig. 16A e C) e observa-se a formação de vacúolos (Fig. 16B).



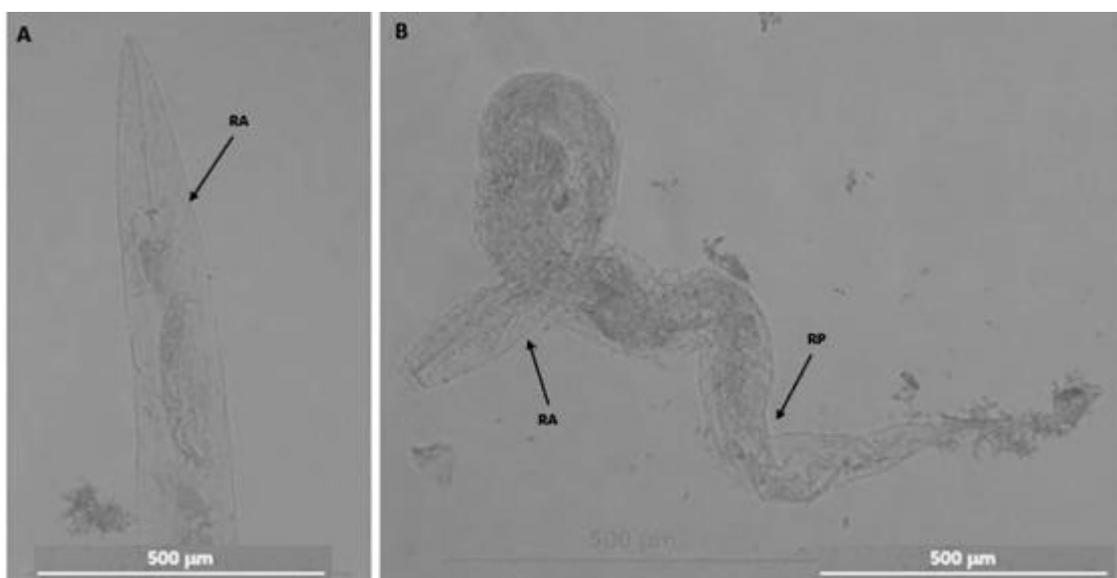
4.8.4 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com ivermectina 10nM

Esta concentração causou intensa descamação na cutícula ao longo de todo o corpo de *C. elegans* (Fig.17A). Foram observadas a formação de pequenos vacúolos (Fig 17B).



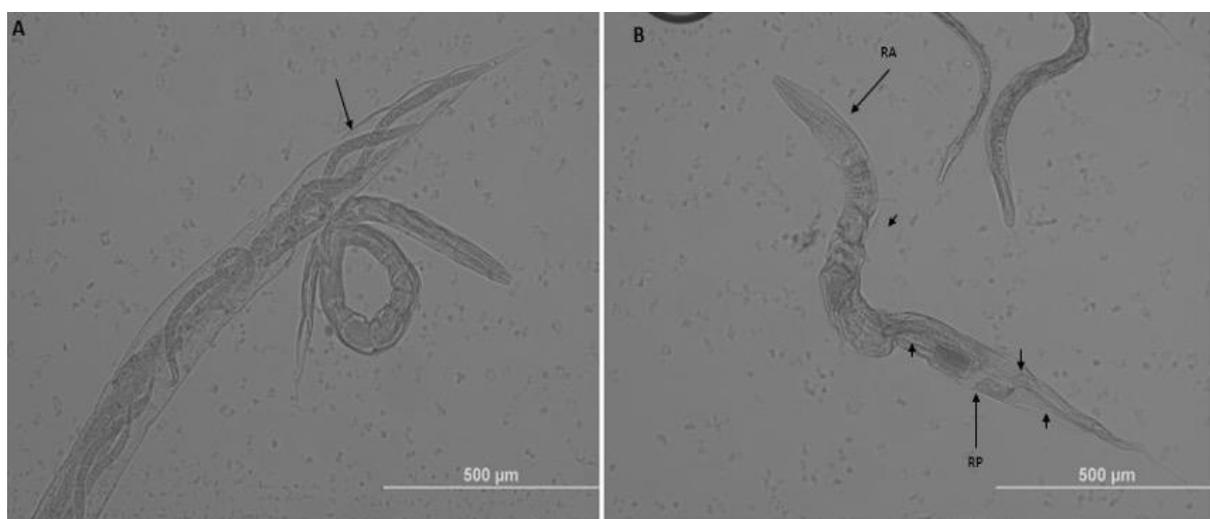
4.8.5 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com ivermectina 20nM

Nesta concentração pode-se observar diversos danos causados a *C. elegans*. Há intensa desorganização e degeneração de estruturas internas, tais como faringe, bulbo, sistema reprodutor e estruturas externas (cutícula) (Fig. 18A, B).



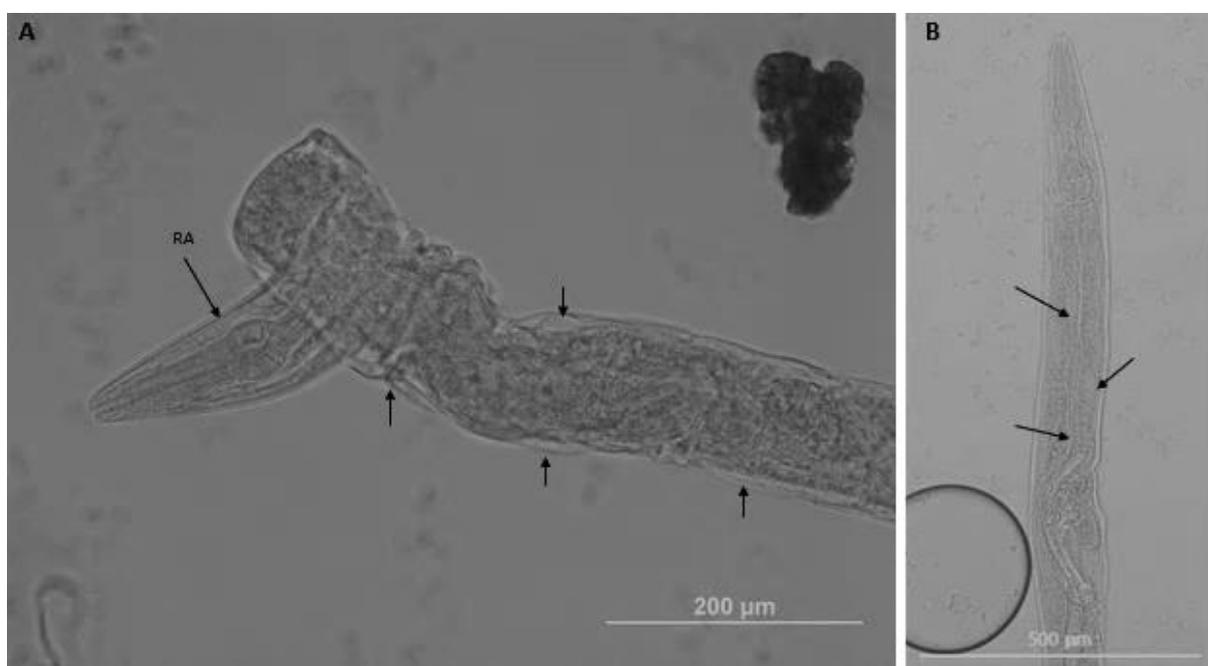
4.8.6 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o extrato bruto AZE 400ng/ml

Nesta concentração foi observado o fenômeno chamado eclosão intrauterina, ou “*endotokia matricida*”, em que o adulto retém os ovos, que eclodem internamente (Fig.19A) e alterações cuticulares em todo o corpo de *C. elegans* (Fig.19B).



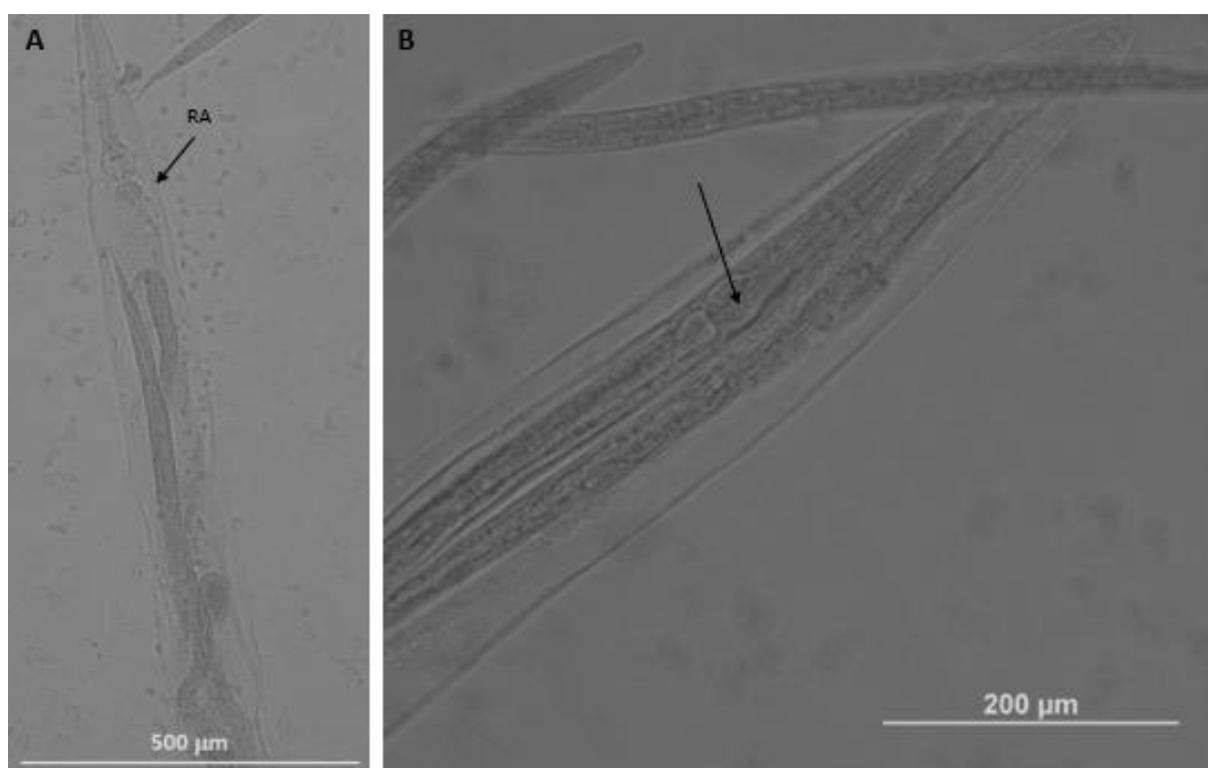
4.8.7 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o extrato bruto AZE 500ng/ml

Na região anterior do nematoide pode-se observar diversas áreas de destruição e descamação na cutícula e severa destruição de estruturas internas, tornando-se impossível visualizar o sistema reprodutor (Fig.20A). Ocorreu a formação de diversos vacúolos (Fig.20B).



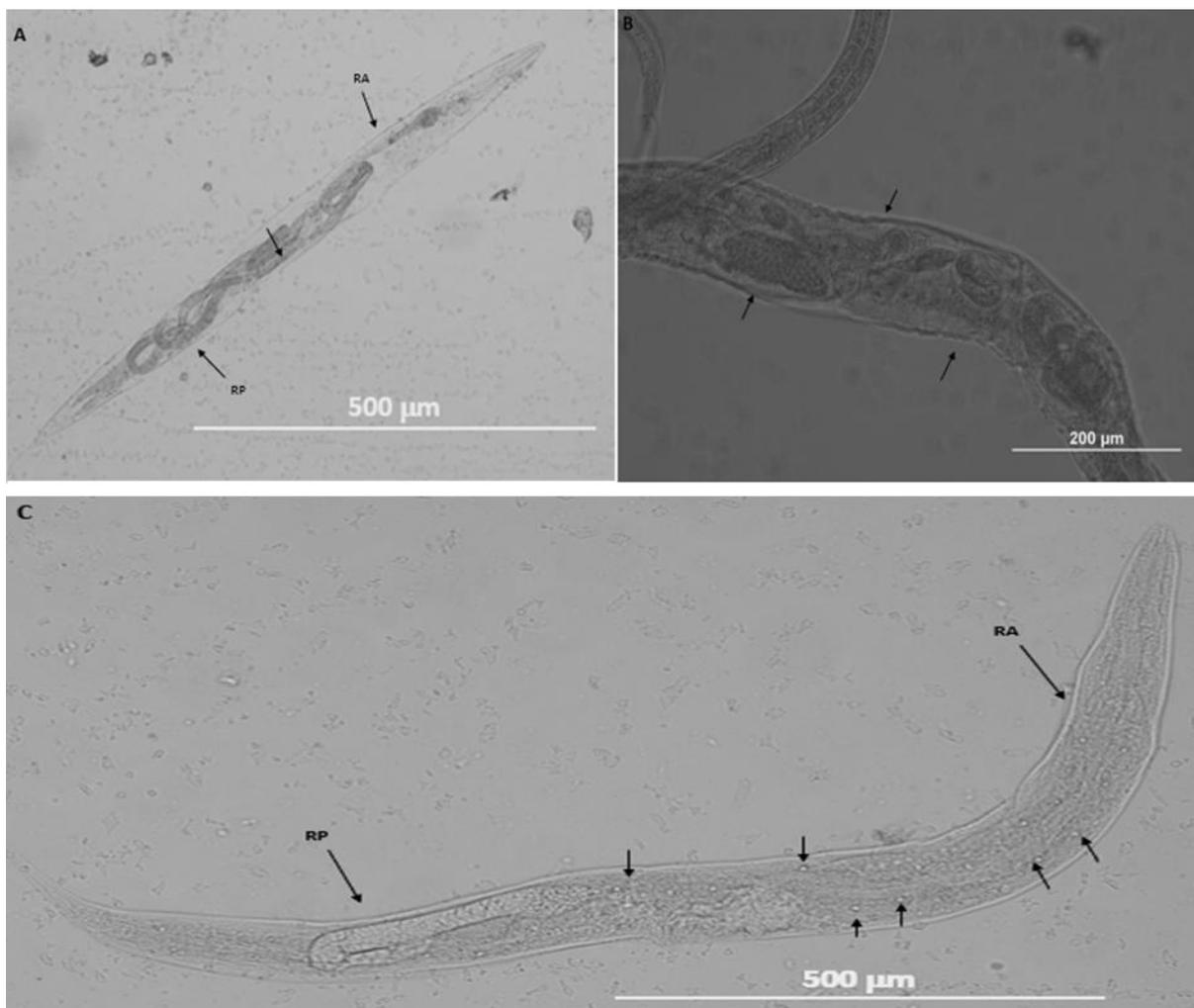
4.8.8 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o extrato bruto AZE 600ng/ml

Foi observado o fenômeno denominado eclosão intrauterina ou *endotokia matricida* (Fig.21A, B), onde foi possível identificar, dentro do adulto, o bulbo do esôfago da larva eclodida durante este processo (Fig.21B).



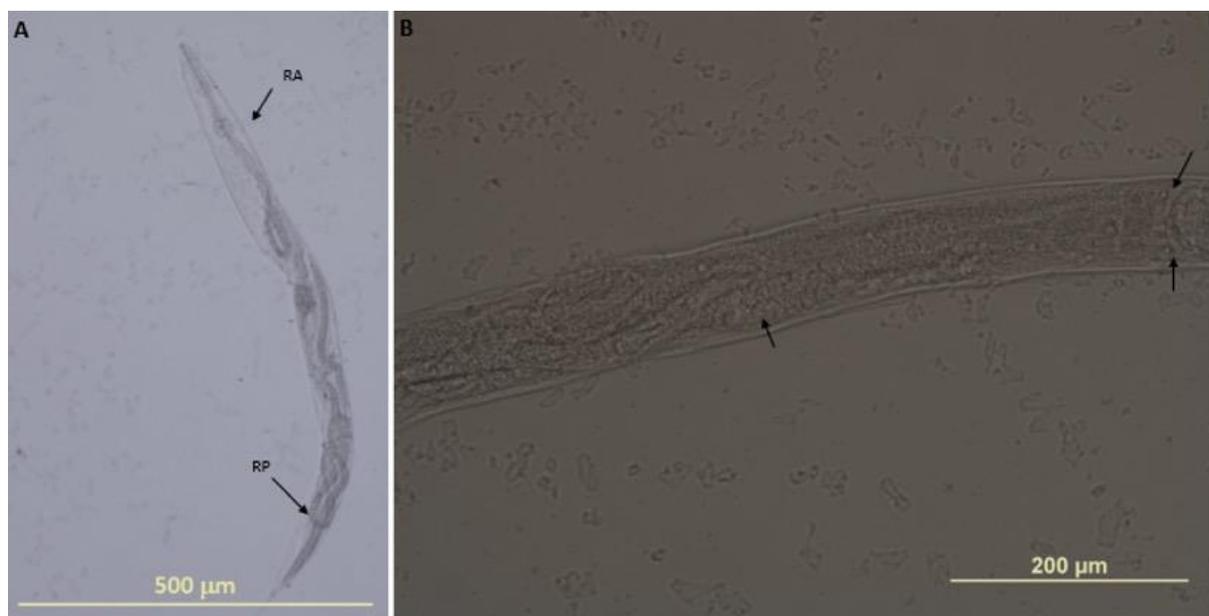
4.8.9 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o extrato bruto AZE 700ng/ml

Foi observado a eclosão intrauterina, com larvas ocupando todo o corpo do nematoide (Fig. 22A). A cutícula sofreu danos, culminando com o seu despregueamento (Fig. 22B). Na parte interna, é possível observar a formação de vacúolos distribuídos desde a região anterior até a posterior (Fig. 22C).



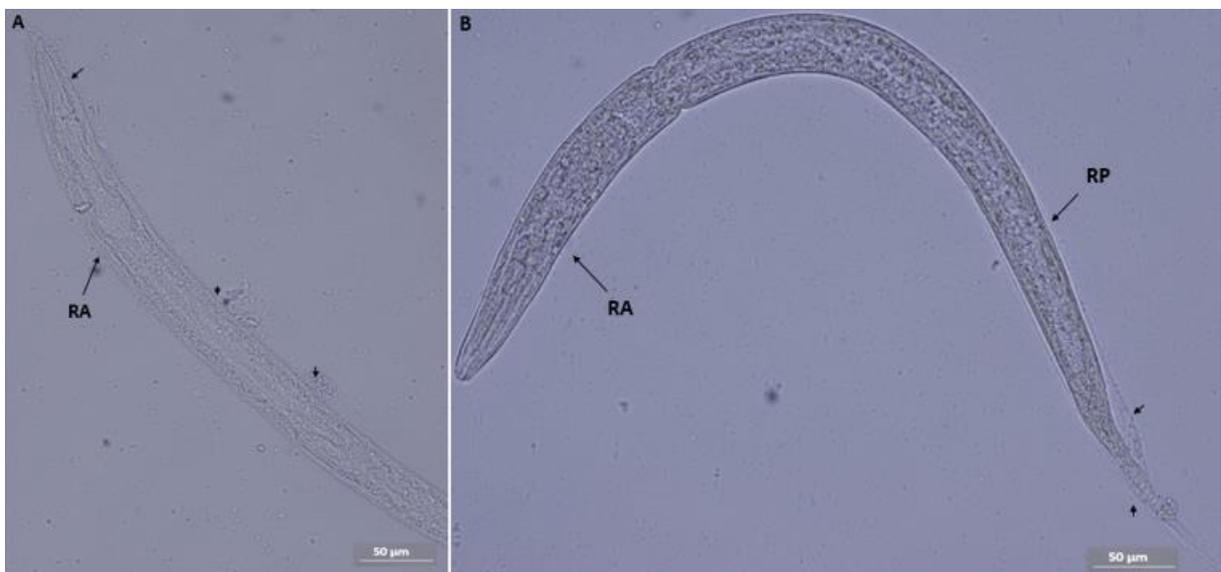
4.8.10 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o extrato bruto AZE 800ng/ml

Pudemos observar o fenômeno chamado eclosão intrauterina, com presença de larvas resultantes de ovos eclodidos dentro do adulto, ocupando a estrutura interna deste (Fig.23A) e formação de vacúolos (Fig.23B).



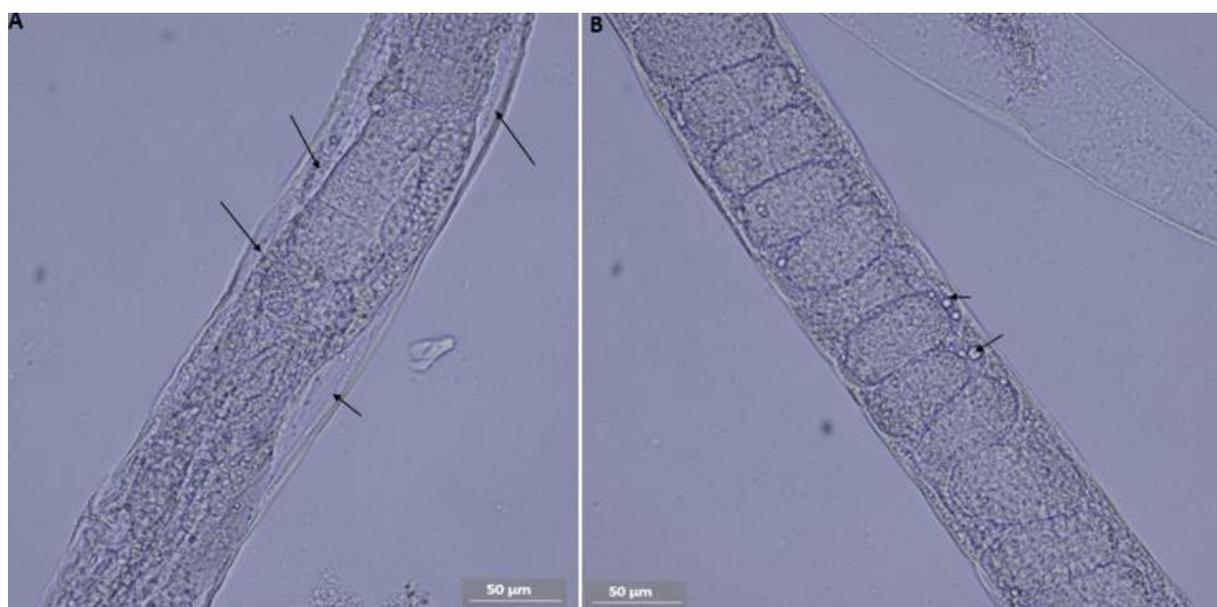
4.8.11 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 0,1mM

Esta concentração causou intensa descamação na cutícula ao longo de todo o corpo de *C. elegans* (Fig.24A) e descamação cuticular na região posterior do nematoide (Fig. 24B).



4.8.12 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 0,3mM

Foi observado o desprendimento da cutícula (Fig.25A) e a formação de vários vacúolos (Fig.25B).



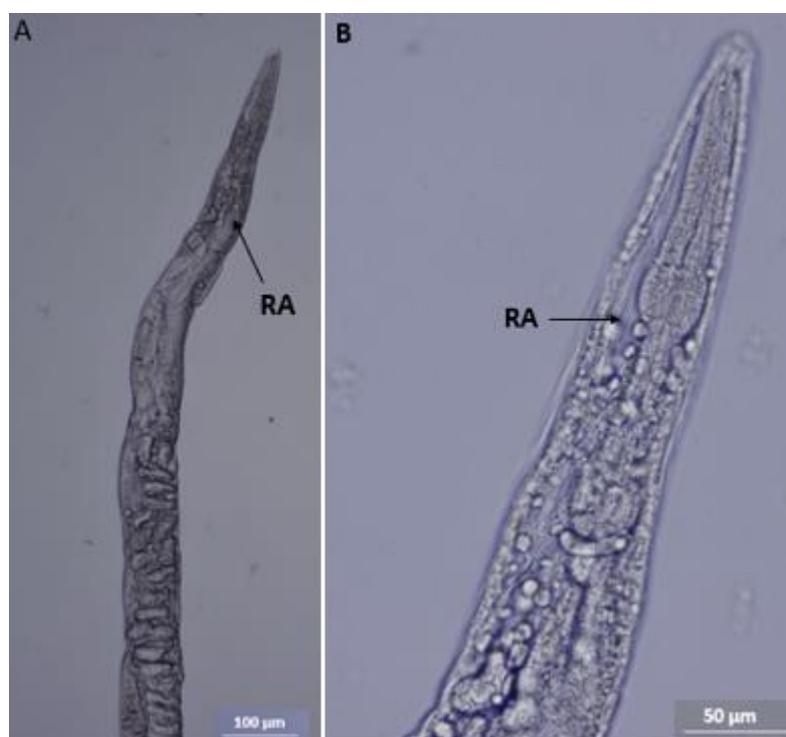
4.8.13 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 1mM

Nesta concentração pudemos observar o desprendimento da cutícula na região anterior (RA) e posterior (RP) (Fig. 26A) e formação de pequenos vacúolos (Fig.26B).



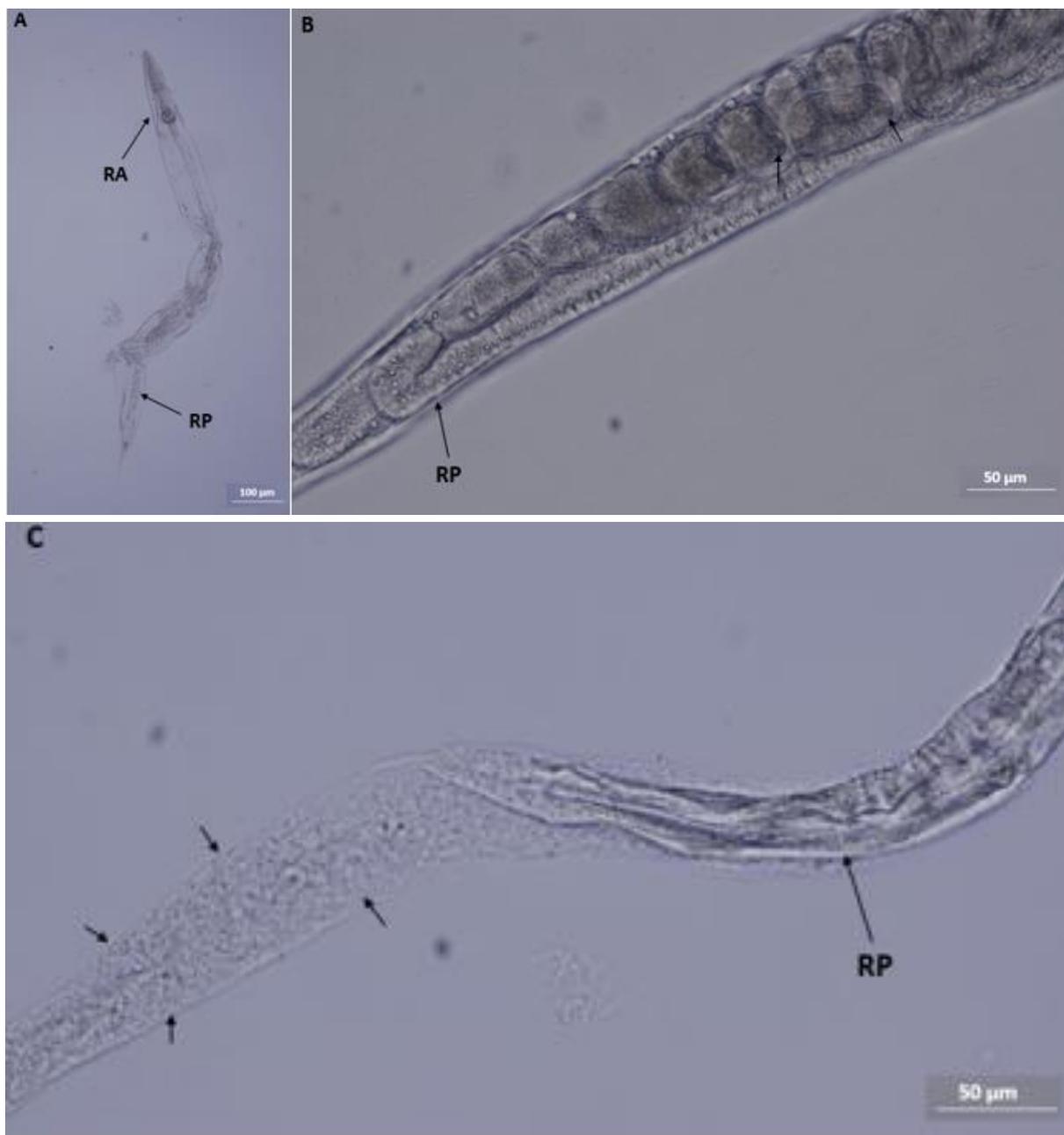
4.8.14 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 3mM

Foi observado severa degradação de estruturas internas, em que os ovos presentes no interior do útero da fêmea encontram-se deformados (Fig. 27A) e formação de vacúolos (Fig.27B).



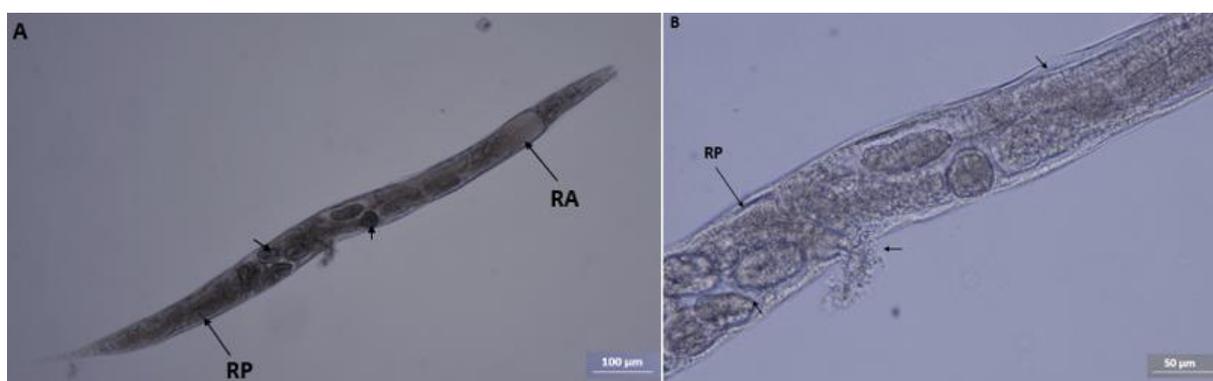
4.8.15 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 10mM

Nesse grupo foi observado severa degradação de estruturas internas (Fig. 28A), ovo presente no útero da fêmea em processo de deformação (Fig. 28B) e descamação da cutícula (Fig. 28C).



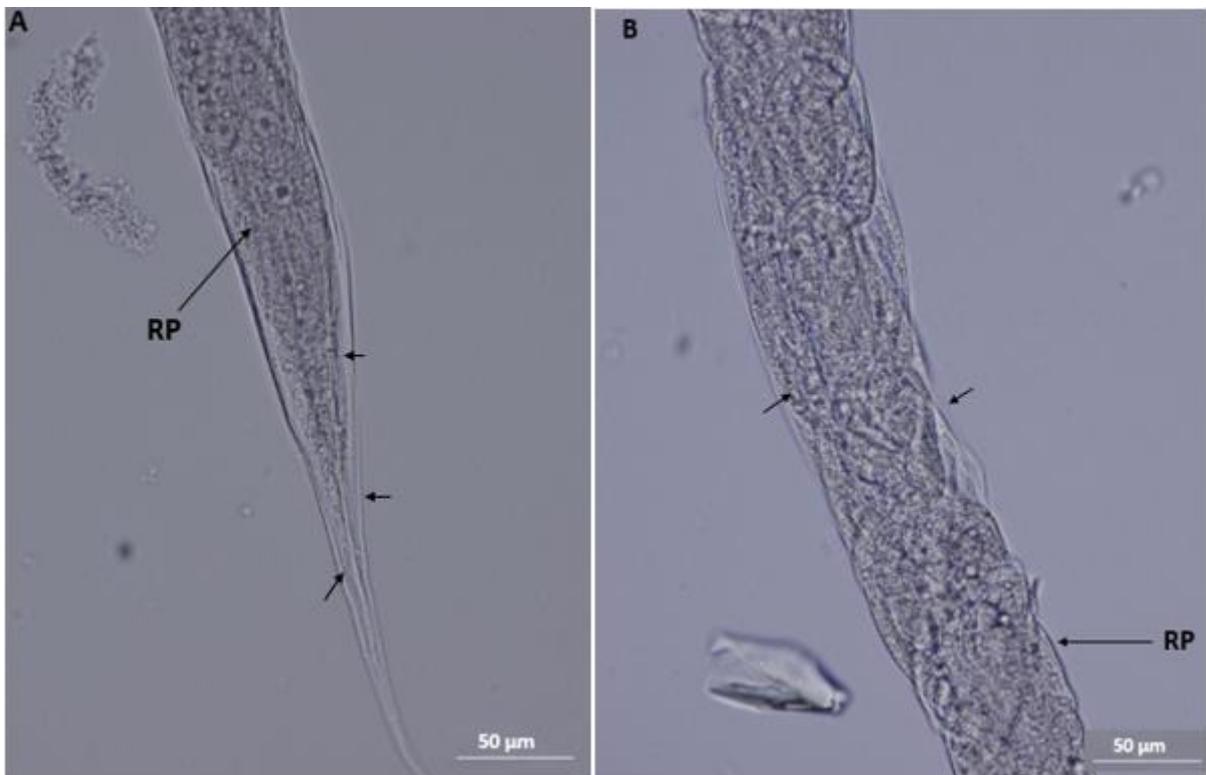
4.8.16 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 30mM

Foi observado a degradação de estruturas internas (Fig. 29A). Também pudemos observar o destacamento de áreas da cutícula e extravasamento de estruturas internas (Fig. 29B).



4.8.17 Alterações morfológicas em *Caenorhabditis elegans* tratados com o elatol 100mM

Nesta concentração pudemos observar a descamação da cutícula (Fig. 30A, B).



4.8.18 Teste da escolha binária em *Caenorhabditis elegans*

O experimento de escolha binária visou avaliar a capacidade dos *C. elegans* em distinguir bactérias patogênicas, de acordo com sua preferência olfativa após a exposição inicial do nematoide a estes microrganismos. No presente estudo, utilizou-se este teste para avaliar a capacidade de *C. elegans* adultos em distinguir entre compostos mais ou menos tóxicos.

Desta forma, foram comparadas as condições de exposição ao extrato bruto AZE e seu metabólito majoritário elatol. Nestes experimentos, em que foram utilizados 51 nematoides no estágio L1, a contagem foi de 18 nematoides no spot do extrato Azeda e 33 no elatol, demonstrando que este teve preferência pelo elatol, sendo o extrato bruto considerado mais tóxico.

5 Discussão

A resistência aos fármacos utilizados para controle parasitário na medicina veterinária é preocupante e tem sido relatada em todas as classes de anti-helmínticos usados na criação de gado. Em algumas regiões do mundo, a prevalência à resistência a multi-drogas (MDR) é muito elevada em nematoides de ovelhas e cabras, ameaçando a viabilidade da criação de pequenos ruminantes. Em humanos, os principais relatos de resistência a anti-helmínticos são daqueles usados para tratamento e controle de tênias e *Schistosoma* sp.. Neste contexto, há uma necessidade urgente de desenvolver novos compostos para controle de helmintíases (Kaplan, 2004; Geerts *et al.*, 2000).

A disponibilidade de anti-helmínticos que temos atualmente é reduzida e possui exemplares com mecanismos de ação não estabelecidos e pouco estudados. Além disso, os efeitos colaterais indesejados aliados à grande resistência, gera uma busca e estímulo ao desenvolvimento de novos compostos. Atualmente não existe um fármaco ideal para o tratamento das infecções, o que gera transtornos nutricionais, intelectuais e afeta diretamente a qualidade de vida do indivíduo. As pessoas de baixo poder econômico são as mais afetadas, o que agrava a situação em que esta já se encontra. As características ideais para o desenvolvimento de um novo fármaco seria baixo custo, pouco ou nenhum efeito colateral, seguro para a utilização em gestantes e crianças, que seja de amplo espectro e que tenha um esquema terapêutico de fácil e curto período de administração (Chehter, 1995; Köhler, 2001).

Os produtos naturais são amplamente utilizados em sua forma bruta como plantas medicinais e pela indústria farmacêutica. Este representa um ponto de partida para a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos fármacos. Os testes em que se utilizam os extratos vegetais e seus metabólitos em modelos experimentais, como o *C. elegans*, podem ser de grande importância para o desenvolvimento de um novo anti-helmíntico. O gênero da alga *Laurencia* possui vários efeitos descritos, porém a espécie *L. dendroidea* ainda não possui seu efeito descrito em helmintos (Vieira *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2013; de Oliveira *et al.*, 2014).

O uso de plantas medicinais tem sido recomendado como uma alternativa para o controle de doenças parasitárias em vários países do mundo, entretanto sua correta indicação clínica só poderá ocorrer após a validação científica de plantas tidas como medicinais (Camurça *et al.*, 2005). No presente estudo, os experimentos com a ivermectina foram de extrema importância para que haja comparação dos resultados obtidos com os produtos naturais com um composto já reconhecido como anti-helmíntico.

A ivermectina é um dos anti-helmínticos mais utilizados atualmente na medicina veterinária e humana. Em uma região da Argentina foi feito um estudo para avaliar o efeito da ivermectina eliminada na matéria fecal de bovinos tratados, em que a coprofauna colonizadora e a degradação física das fezes depositadas naturalmente sofreram análise. Foram avaliados dois grupos de bovinos, em que um deles não recebeu tratamento (controle) e o outro recebeu 0,2mg/kg de ivermectina subcutânea. A partir das fezes dos animais foram recolhidas amostras e estas analisadas. Todas as amostras recolhidas do grupo tratado acusaram a presença de ivermectina. Como resultado, foi observada a menor presença de dípteros, artrópodes e ácaros e menor velocidade na degradação destas fezes. Este estudo demonstra que a ivermectina possui um efeito indesejável sobre o ambiente, pois afeta diretamente a biodiversidade (Iglesias *et al.*, 2005).

O resultado obtido nos ensaios realizados com a ivermectina mostrou que esta afeta severamente a sobrevivência de *C. elegans*, sendo seu efeito dependente da dose utilizada, obtendo-se mortalidade de 100% da população com a concentração de 20nM e obtendo-se um IC₅₀ de 0,1354nM. Nos ensaios com o extrato bruto da alga *L. dendroidea* e do metabólito elatol, foi constatado que estes afetam a sobrevivência de *C. elegans* adultos após três dias de tratamento. A concentração de 800ng/ml do extrato bruto e a de 100nM do elatol se mostraram as mais eficazes, obtendo-se IC₅₀ de 261,2ng/ml e 67,07mM, respectivamente. O tratamento com as outras concentrações mostraram efeitos similares entre elas. Foram observadas diversas alterações morfológicas e estruturais semelhantes nos helmintos tratados com a ivermectina, extrato bruto e elatol, demonstrando atividade anti-helmíntica do extrato AZE e do elatol obtido de *L. dendroidea*.

No presente estudo, uma característica importante demonstrada pelo tratamento de *C. elegans* com a ivermectina, com o extrato da alga *L. dendroidea* e do elatol, foi o destacamento e danos severos na cutícula deste nematoide, que foi observado nas concentrações de ivermectina 1, 10 e 20nM, no extrato AZE 400, 500 e 700ng/ml e no elatol 0,1mM, 0,3mM, 1mM, 10mM, 30mM e 100mM. A cutícula é essencial à vida de *C. elegans*, pois é uma barreira entre este e o ambiente, confere resistência, proteção e é crucial na etapa da muda, na qual o nematoide passa do estágio de ovo a adulto. Danos na cutícula podem causar o extravasamento de estruturas internas. Estes efeitos podem afetar diretamente a sobrevivência de *C. elegans*. Resultado semelhante foi observado em outros nematoides, como *Wuchereria bancrofti* (Oliveira Menezes *et al.*, 2007). Neste estudo, a análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou descamação na superfície cuticular, similar ao observado em nematoides obtidos de pacientes que receberam a co-administração dos anti-helmínticos dietilcarbamazina e

albendazol. Os nematoides de pacientes tratados apenas com dietilcarbamazina não apresentaram estas alterações. Em ambos os casos os nematoides permaneceram vivos até a retirada cirúrgica.

Outros trabalhos mostraram resultados semelhantes aos obtidos em nossos resultados. Sukontason *et al.* (2000) analisando a larva L3 de *Gnasthostoma spinigerum* ao microscópio eletrônico de varredura, tratados *in vitro* com albendazol nas concentrações de 1 e 2 µg/ml, observou acentuadas mudanças na morfologia da superfície da larva, em que a superfície da região anterior estava inchada e as espículas localizadas na região posterior foram removidas. Segundo um estudo feito com *C. elegans* por Sant'anna *et al.* (2016), trifuralina a 25 µM causou destacamento de certas áreas da cutícula adjacente a hipoderme em um grande número de nematoides após sete dias de tratamento.

Os produtos naturais são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, e muitos deles que foram estudados, apresentam resultados similares aos nossos. Em um estudo feito para detectar a ação anti-helmíntica de inibidores de cisteíno-proteinases da planta *Carica papaya*, mostrou que 30 minutos de contato com a planta na temperatura de 20°C são suficientes para causar ruptura da cutícula e extravasamento de estruturas internas em *C. elegans* (Phiri *et al.*, 2017).

Em um estudo feito para avaliar a atividade do extrato aquoso de gengibre contra *Schistosoma mansoni*, 16 camundongos foram infectados com cercarias e divididos em dois grupos: não tratados e tratados com o extrato. Após 10 semanas, os camundongos foram sacrificados e os helmintos obtidos do tecido hepático tiveram sua topografia de superfície avaliada através da microscopia eletrônica de varredura. O estudo revelou que os helmintos machos provenientes de camundongos tratados com o extrato de gengibre tiveram perda da arquitetura de seu revestimento superficial, com perda parcial dos espinhos dos tubérculos, extensiva erosão em regiões do tegumento com formação de “bolhas” ao redor deste. Estes resultados sugerem que o extrato de gengibre possui atividade anti-*Schistosoma*, promovendo base para novos experimentos (Molinski *et al.*, 2009). O efeito da cúrcuma também tem sido largamente investigado. A tubulina é a proteína mais abundante no citoesqueleto do protozoário *Giardia lamblia*, e para elucidar o efeito da cúrcuma, trofozoítos foram tratados e as células avaliadas ao microscópio eletrônico de varredura. A cúrcuma inibiu a proliferação e adesão de *Giardia* as concentrações de 3 e 15 µM causaram ruptura do citoesqueleto de trofozoítos, mostrando que a cúrcuma inibe a proliferação destes por alterações nos microtúbulos (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Em um estudo feito por Dodd *et al.* (2018), foram analisados genes requeridos na manutenção da integridade da cutícula e epiderme de *C. elegans* em resposta a diversos fatores de estresse celular. Foi mostrado que a ruptura em determinados locais da cutícula pode coativar a detoxificação, hiperosmolaridade e alterar a resposta a antimicrobianos, ressaltando que os sensores localizados na cutícula que coordena estes fatores são afetados.

Durante os três dias de incubação com o elatol, foi observado que o tratamento com as concentrações 0,3mM, 1mM, 3mM, 10mM, 30mM e 100mM foi capaz de causar letargia e baixa movimentação dos *C. elegans* adultos. Esta redução na motilidade pode prejudicar suas funções biológicas e consequentemente afetar sua sobrevivência. Plenefisch e Hedgecock (2000) obtiveram resultados semelhantes aos nossos, em que a separação da camada muscular da cutícula através da ruptura no interior da hipoderme pode causar paralisia em *C. elegans* culminando com sua morte. Estes estudos mostram a relação das alterações encontradas na cutícula com a redução na motilidade, evidenciando mais uma vez a importância da integridade da cutícula.

No presente estudo foi observado severa destruição de estruturas internas de *C. elegans* adultos nas concentrações de 1, 5 e 20nM de ivermectina, 500ng/ml do extrato bruto AZE e 0,1mM, 3mM, 10mM e 30mM do elatol, em que o corpo do nematoide se apresenta tão desorganizado que não é possível identificar tais estruturas, como por exemplo, os componentes do aparelho digestivo e reprodutor, que foram facilmente identificados no controle. Resultados semelhantes foram observados em um estudo com o anti-helmíntico albendazol para investigar a viabilidade, morfologia e ultraestrutura de diferentes estágios de *C. elegans*, em 7 dias de tratamento, que, ao microscópio eletrônico de varredura e transmissão, observou-se severa destruição das estruturas internas, além de uma intensa descamação da cutícula e da superfície dos ovos, impedindo o desenvolvimento de ambos (Sant'anna *et al.*, 2013).

A degradação de estruturas internas também foi observada em um estudo com *C. elegans* em um tratamento de três dias com trifuralina e orizalina a 25 μ M. Este estudo também apresentou como resultado a severa desorganização de estruturas internas de larvas L3-L4 (Sant'anna *et al.*, 2016). O mesmo foi observado por Roy *et al.* (2009), em que a incubação de *Raillietina echinobothrida* com o extrato de *Millettia pachycarpa* causou degradação interna de estruturas, sendo esta relacionada ao rompimento de mitocôndrias, núcleo, nucléolo, membrana celular, lâmina basal, vacuolização tegumentar e no citoplasma distal. O mesmo efeito também foi obtido no experimento feito com o extrato etanólico de *Alpinia nigra*, uma planta medicinal usada tradicionalmente como anti-helmíntico entre a tribo Tripuri no Nordeste da Índia. O estudo feito com o trematoda *Fasciolopsis busquei* e a planta, mostrou que a

desorganização de estruturas internas pode estar relacionada a depleção do parênquima e perda dos túbulos de conexão celular, fazendo com que as células perdessem suas formas e delimitações (Roy *et al.*, 2009).

Em um estudo feito para investigar a ação do sesquiterpeno elatol extraído da alga vermelha *Laurencia dendroidea* em *Leishmania amazonensis*, após 72hs de tratamento, revelaram algumas alterações morfológicas vistas ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão. Parasitos tratados com elatol revelaram notáveis mudanças morfológicas quando comparadas com as células controle, incluindo pronunciado inchaço da mitocôndria, aparição de estruturas concêntricas dentro de organelas, desestabilização da membrana plasmática, formação de estruturas de membrana, aparentemente uma extensão do retículo endoplasmático, o que sugere um processo autofágico (Santos *et al.*, 2010).

Nas concentrações de 400, 600, 700 e 800ng/ml do extrato bruto AZE, foi observado o fenômeno chamado *Endotokia matricida* ou Eclusão intrauterina. De acordo Trent *et al.* (1983) e Clutton-Brock (1991), este processo ocorre pela possível indução de inanição dos nematoides. Este fenômeno é típico de espécies da família Rhabditidae e ocorre em resposta ao estresse alimentar quando a fêmea atrasa o processo reprodutivo. Entretanto, a larva pode se desenvolver normalmente quando deixa o corpo da fêmea morta e continua o desenvolvimento normal (Chen e Caswell-Chen, 2004). O mesmo efeito foi relatado por Sant'anna *et al.* (2013) em *C. elegans* adultos tratados durante 3 dias com albendazol 25 µM. Recentes estudos feitos para investigar os efeitos do orizalina e trifluralina (que possuem mecanismo de ação semelhante ao albendazol) a 25 µM também mostraram a eclusão intrauterina em nematoides adultos (Sant'anna *et al.*, 2016).

Nas concentrações de ivermectina 5 e 10nM, do extrato AZE 500, 700 e 800ng/ml e do elatol 0,3mM, 1mM e 3mM, foram observadas a formação de vacúolos, que sugerem, segundo um estudo feito por Sant'anna *et al.* (2016), serem vacúolos autofágicos. Neste trabalho de Sant'anna *et al.* (2016) foi observada a formação destes vacúolos, através de microscopia eletrônica de transmissão, em *C. elegans* tratados com orizalina 25µM. Isto sugere que os fármacos utilizados levam ao processo de autofagia. O mesmo padrão foi observado por Cárdenas *et al.* (2010) no sistema reprodutor de *Litosomoides chagasfilhoi* obtidos de hospedeiros tratados com uma única dose de 40mg/kg de albendazol, que relata o útero com danos severos e vacuolização do citoplasma. No presente trabalho, estas alterações foram observadas ao microscópio óptico, necessitando mais detalhamento em etapas posteriores que serão realizadas através da microscopia eletrônica de transmissão, porém, já sugerem alterações

que podem causar prejuízos na fisiologia normal de *C. elegans*, com consequências danosas ao seu metabolismo, o que irá dificultar sua sobrevivência.

Na concentração de 30mM do elatol foi observado o extravasamento de estruturas internas do *C. elegans*. Efeito semelhante foi observado Fritz *et al.* (2009) em que o gene *cuti-1*, relacionado à integridade epitelial foi estudado e relacionado a uma proteína específica para este nematoide. Este efeito obtido no nosso estudo mostra que o elatol pode agir na cutícula, causar dano e provocar a perda de estruturas internas para o exterior. Phiri *et al.* (2017) obteve o mesmo resultado em *C. elegans* em um estudo feito para avaliar a ação anti-helmíntica da planta *Carica papaya* que causou ruptura da cutícula e extravasamento de estruturas internas no nematoide.

O teste de inibição de eclosão de larvas L1 a partir de ovos foi desenvolvido para avaliação da resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais (Coles *et al.*, 1992) e, atualmente, é amplamente utilizado para avaliação do potencial anti-helmíntico de plantas. O extrato da folha de *Annona muricata* mostrou atividade anti-helmíntica no nematoide *Haemonchus contortus*, mostrando eficácia no teste de eclosão de larvas L1 a partir de ovos, uma vez que a concentração de 50% do extrato inibiu a eclosão de 84,91% de L1. Este agiu alterando a motilidade de adultos, com completa perda desta após 6-8hs de exposição, e também de 83,29% da motilidade das larvas (Ferreira *et al.*, 2013).

Recentes estudos com a miltefosina foram feitos para avaliar a viabilidade, morfologia e ultraestrutura do ciclo de vida de *C. elegans* e a forma larval infectante do parasito *Strongyloides venezuelensis*. Este fármaco mostrou atividade contra formas adultas de *C. elegans* e inibiu a eclosão de larvas L1 a partir de ovos, levando a mortalidade embrionária e mostrando atividade larvicida contra *C. elegans* e *S. venezuelensis* após 24hs de tratamento. A análise ao microscópio eletrônico mostrou que a miltefosina induz morte embrionária seletiva, levando à morte celular (Sant'anna *et al.*, 2018) Em nosso trabalho, apenas a ivermectina mostrou efeito no teste da eclosão de larvas L1 a partir dos ovos tratados. O extrato bruto AZE e o elatol não foram capazes de alterar a eclosão de larvas L1, mostrando que seu efeito deva ocorrer em formas mais maduras.

Outros estudos mostraram a atividade anti-*Trypanosoma* do sequiterpeno elatol, obtido de algas vermelhas *Laurencia dendroidea*. Através da microscopia eletrônica, o efeito do elatol na morfologia e ultraestrutura do parasito foi avaliado, mostrando este ser concentração-dependente contra epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Observações ao microscópio óptico em formas amastigotas intracelulares tratadas demonstraram uma total eliminação da infecção na dose de 3,0 μ m, sem afetar células sanguíneas vermelhas. Ao microscópio

eletrônico e de transmissão, células com formas aberrantes e “quebras” na membrana plasmática foram observadas, além de mitocôndrias inchadas e extensiva formação de vacúolos citoplasmáticos em todas as formas (Veiga-Santos *et al.*, 2010).

Nas concentrações de 3mM e 10mM do elatol, a morfologia dos ovos presentes nos adultos de *C. elegans* se apresentaram alteradas, além de vários helmintos adultos sem ovos no seu interior. Nos ensaios com adultos, as concentrações de 500ng/mL, 600ng/mL e 800ng/mL do extrato bruto AZE apresentaram atraso reprodutivo, ou seja, durante os três dias de incubação, estes somente expulsaram os ovos presentes no seu interior no terceiro dia. Foi observada a presença de larvas L1 e ovos somente 48hs após o contato com o extrato. Estes resultados demonstram que o elatol e o extrato bruto exercem efeito sobre o aparelho reprodutivo de hermafroditas de *C. elegans*, podendo interferir na reprodução ou diretamente na embriogênese.

Efeitos semelhantes foram obtidos por Godinho *et al.* (2014), em que a planta *Tanacetum vulgare* causou a morte de parasitos adultos, diminuiu a viabilidade e causou um decréscimo na produção e desenvolvimento de ovos em um estudo feito com *S. mansoni*. Em um estudo com extrato da fruta *Mangifera indica* L. (Mango) mostrou que este causou 100% de inibição do desenvolvimento larval em *Strongyloides stercoralis* (El-Sherbini e Osman, 2013).

O estudo da atividade anti-helmíntica de plantas medicinais em ruminantes tem atraído bastante interesse. *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) é uma das espécies de hortelã que tem sido utilizada popularmente devido às diversas propriedades medicinais, inclusive para o controle de verminoses. Em um estudo que teve como objetivo testar a atividade anti-helmíntica do hidrolato dessa planta em bezerras infectadas por nematoides gastrintestinais, foi demonstrada a atividade ovicida significativa sobre nematoides gastrintestinais em bezerras (Nascimento *et al.*, 2009). Em nosso estudo, a morfologia dos ovos de alguns dos nematoides incubados com o elatol se apresentou alterada, mostrando que este exerce efeito negativo nestes e no sistema reprodutor. Estes efeitos irão prejudicar a morfologia dos nematoides e consequentemente impedir a proliferação.

C. elegans se alimenta da *E. coli* OP50, mas é suscetível à infecção por bactérias patogênicas em seu ambiente natural. O experimento de escolha binária com bactérias visa avaliar a capacidade dos *C. elegans* em distinguir as patogênicas, de acordo com sua preferência olfativa após a exposição inicial do nematoide a estes microrganismos. O *C. elegans* é capaz de evitar o odor da bactéria que ele considera mais patogênica e aumentar sua atração por odores de bactérias menos patogênicas (Zhang, Lu e Bargmann, 2005).

Através do conhecimento do teste da escolha binária, no presente estudo, o mesmo foi aplicado para que o *C. elegans* pudesse escolher entre o extrato bruto AZE e o elatol, mostrando

assim, qual seria o menos prejudicial para ele. Em nosso resultado, foi demonstrado que o elatol é menos tóxico do que o extrato bruto da alga. Este resultado se deve provavelmente à presença de outros metabólitos no extrato bruto da alga. Mesmo o elatol sendo o metabólito majoritário, sabe-se que no extrato bruto da alga *Laurencia dendroidea* há a presença, mesmo que em pouca quantidade, de isoobtusol e triquinano (Machado *et al.*, 2016).

Sabe-se que linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. A base dos ensaios de citotoxicidade está exatamente na avaliação da interferência induzida por agentes químicos nos processos metabólicos celulares e na investigação a respeito da maneira em que esses processos podem vir a intervir no crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo culminar na morte celular, reduzindo, assim o número de células viáveis se comparado com culturas controles não-tratadas. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos quantificados, contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis são extensamente empregados em processos de triagem (Freshney, 1994).

Dentre os desfechos que fornecem informações sobre diferentes funções celulares, aqueles que utilizam estimativas quantitativas sobre funções metabólicas (NRU e MTT) são os mais usados. Apesar destes ensaios apresentarem vantagens como precisão e serem sujeitos a automação, eles são extremamente dependentes de possíveis alterações fisiológicas celulares, como alterações nas atividades lisossomal (NRU) e mitocondrial (MTT). Estes parâmetros são dependentes das condições da cultura celular, que podem ser modificados por aspectos como densidade celular e secreção celular (Margis e Borojevich, 1989).

Em um estudo feito para avaliar o potencial citotóxico dos metabólitos de *L. dendroidea* contra quatro linhagens de células tumorais, foi investigada também a citotoxicidade do extrato bruto de *L. dendroidea* coletada na Praia de Biscaia (que também tem o elatol como metabólito majoritário em maior proporção), do elatol e de outros sesquiterpenos em células polimorfonucleares de sangue periférico de doadores saudáveis através do ensaio MTT. Nestes ensaios, foi observado que o extrato bruto, elatol e obtusol não foram citotóxicos, pois não foram capazes de diminuir a viabilidade dos polimorfonucleares em concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL (Marini *et al.*, 2018). O IC₅₀ encontrado para o extrato bruto Azeda no presente estudo foi cerca de cinco vezes menor do que a menor concentração utilizada por Marini *et al.* (2018).

O elatol também mostrou atividade contra *Leishmania amazonensis* em promastigotas. As concentrações de 4µM e 7,5 µM induziram inibição do crescimento de 50% e 90%, respectivamente após 72hs de tratamento. Este tratamento causou ruptura de membrana, perda de seu conteúdo e formação de vacúolos autofágicos. No mesmo trabalho,

a citotoxicidade do elatol também foi avaliada em macrófagos na dose de 1,4 μ M, mostrando que esta foi três vezes menos tóxica em macrófagos do que nos protozoários (Santos *et al.*, 2010). No nosso estudo, o metabólito elatol foi utilizado nas concentrações de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100mM.

A ivermectina já apresenta sua ação anti-helmíntica confirmada, entretanto não existem trabalhos que demonstrem o efeito morfológico deste fármaco em *C. elegans*. No presente estudo, a observação de seus efeitos foi importante para a comparação com os efeitos do extrato e do elatol, que se mostraram muito semelhantes no nematoide *C. elegans*. Nossos resultados mostraram que o extrato da alga *Laurencia dendroidea* e do metabólito elatol, possuem atividade nos adultos de *C. elegans*, causando severas alterações morfológicas. Entretanto, o extrato bruto AZE e elatol não alteraram a eclosão de larvas L1 a partir do tratamento dos ovos, sugerindo que o mecanismo de ação dos compostos está relacionado a formas maduras de *C. elegans*. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que o extrato bruto e o elatol são candidatos potenciais para o tratamento de helmintíases.

A tabela a seguir sumariza as alterações morfológicas observadas em cada concentração de cada composto. Esta se mostra importante para efeito de comparação para as alterações encontradas, que são similares entre elas.

Tabela 4- Alterações morfológicas observadas em cada concentração utilizada

Concentração	Alteração morfológica
Ivermectina 1nM	Degradação de estruturas internas Descamação cuticular
Ivermectina 5nM	Degradação de estruturas internas Formação de pequenos vacúolos
Ivermectina 10nM	Descamação cuticular Formação de pequenos vacúolos
Ivermectina 20nM	Degradação de estruturas internas Descamação cuticular
Extrato bruto 400ng/ml	Eclosão intrauterina Descamação cuticular
Extrato bruto 500ng/ml	Descamação cuticular Degradação de estruturas internas Formação de pequenos vacúolos
Extrato bruto 600ng/ml	Eclosão intrauterina
Extrato bruto 700ng/ml	Eclosão intrauterina Formação de pequenos vacúolos
Extrato bruto 800ng/ml	Eclosão intrauterina Formação de pequenos vacúolos
Elatol 0,1mM	Degradação de estruturas internas Descamação da cuticular
Elatol 0,3mM	Descamação cuticular Formação de pequenos vacúolos
Elatol 1mM	Descamação cuticular Formação de pequenos vacúolos
Elatol 3mM	Degradação de estruturas internas Formação de pequenos vacúolos
Elatol 10mM	Degradação de estruturas internas Descamação da cuticular
Elatol 30mM	Degradação de estruturas internas Descamação cuticular Extravasamento de conteúdo interno
Elatol 100mM	Descamação cuticular

Em conclusão, o extrato bruto AZE e o elatol provenientes da alga *Laurencia dendroidea* produzem efeitos danosos na sobrevivência e na morfologia de *C. elegans* adultos, mostrando resultados semelhantes a outros anti-helmínticos estudados. Ivermectina é capaz de diminuir a eclosão de larvas L1 a partir de ovos tratados com o IC₅₀, efeito não observado com o tratamento dos ovos com o IC₅₀ do extrato bruto e do elatol. Os resultados obtidos nos mostram que estes apresentam um potencial como alternativa para o desenvolvimento de um novo fármaco anti-helmíntico.

6 Bibliografia

ABONGWA, Melanie et al. The cholinomimetic morantel as an open channel blocker of the *Ascaris suum* ACR-16 nAChR. *Invertebrate Neuroscience*, v. 16, n. 4, p. 10, 2016.

AFONSO, PRISCILLA; SILVA, VANESSA SANTOS; TAKEDA, GENTILDA KAZUKO FUNAYAMA. LEVANTAMENTO DE INFECÇÕES POR PARASITAS GASTROINTESTINAIS. *Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)*, v. 2, n. 3, 2014.

ALCAINO, H. Parásitos del perro y su epidemiología y control. V Jornadas de Parasitología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. pp, p. 98-112, 1987.

AL-ENAZI, Nouf M. et al. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of *Laurencia catarinensis*, *Laurencia majuscula* and *Padina pavonica* extracts. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017.

ALTUN, Z. F.; HALL, D. H. Handbook of *C. elegans* Anatomy. WormAtlas. <http://www.wormatlas.org/handbook/contents.htm>, 2005.

ANTOSHECHKIN, Igor; STERNBERG, Paul W. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 7, p. 518-532, 2007.

ARFAA, Fereudoun. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XII. Ascariasis and trichuriasis. *Rev. Infect. Dis.*, 6 (1984), pp. 364-373

AVILA, Daiana; HELMCKE, Kirsten; ASCHNER, Michael. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. *Human & experimental toxicology*, v. 31, n. 3, p. 236-243, 2012.

BARCELLOS MARINI, Maíra et al. Cytotoxic activity of halogenated sesquiterpenes from *Laurencia dendroidea*. *Phytotherapy Research*, 2018.

BAWAKID, Nahed O. et al. Bio-active maneonenes and isomaneonene from the red alga *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry*, v. 143, p. 180-185, 2017.

BIANCO, Éverson Miguel et al. Antimicrobial (including antimollicutes), antioxidant and anticholinesterase activities of Brazilian and Spanish marine organisms—evaluation of extracts and pure compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 6, p. 668-676, 2015.

BLAXTER, Mark. Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS biology*, v. 9, n. 4, p. e1001050, 2011.

BLEAKLEY, Hoyt. Disease and development: evidence from hookworm eradication in the American South. *The Quarterly Journal of Economics*, v. 122, n. 1, p. 73-117, 2007.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. *Introduction to the Algae: Structure and Reproduction*, 706pp. 1985.

BONGERS, Tom. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*, v. 83, n. 1, p. 14-19, 1990.

BONGERS, Tom; BONGERS, Marina. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, v. 10, n. 3, p. 239-251, 1998.

BORN, Flavia Souza; BIANCO, Everson Miguel; DA CAMARA, C. A. Acaricidal and repellent activity of terpenoids from seaweeds Collected in Pernambuco, Brazil. *Natural product communications*, v. 7, n. 4, p. 463-466, 2012.

BRASIL. Guia Prático para o Controle das Geo-helminthíases [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 33 p. Disponível em: <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_controle_geohelminthiases.pdf> Acesso em: 11 de janeiro de 2019.

BRENNER, Sydney. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

CAMPBELL, W. C. et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, v. 221, n. 4613, p. 823-828, 1983.

CAMPBELL, W. C. Ivermectin and heartworm. In: *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 1987. p. 48.

CAMPBELL, W. C.; BENZ, G. W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 7, n. 1, p. 1-16, 1984.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.

CASSADA, Randall C.; RUSSELL, Richard L. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, v. 46, n. 2, p. 326-342, 1975.

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; MARTINS, F. S. V. Infecções por helmintos e enteroprotzoários. Rio de Janeiro: Centro de Informações em Saúde para Viajantes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

CHEN, Jianjun; CASWELL-CHEN, Edward P. Facultative vivipary is a life-history trait in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of nematology*, v. 36, n. 2, p. 107, 2004.

CHEHTER, Luiz; CABEÇA, Marcos; CATAPANI, W. R. Parasitoses intestinais. *Revista brasileira de medicina*, v. 51, n. 1, p. 126-32, 1995.

CHILTON, Neil B. et al. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 40, n. 1, p. 118-128, 2006.

COLES, G.C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F.H.M. et al. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, v.44, p.35-44, 1992

COSTA, Michael; DRAPER, Bruce W.; PRIESS, James R. The Role of Actin Filaments in Patterning the *Caenorhabditis elegans* Cuticle. *Developmental biology*, v. 184, n. 2, p. 373-384, 1997.

CLUTTON-BROCK, Tim H. *The evolution of parental care*. Princeton University Press, 1991.

CROMPTON, David William Thomasson; NESHEIM, M. C. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annual review of nutrition*, v. 22, n. 1, p. 35-59, 2002.

DA SILVA MACHADO, Fernanda Lacerda et al. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta medica*, v. 77, n. 07, p. 733-735, 2011.

DA SILVA, Elizângela F. et al. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 38, p. 35-43, 2009.

DAMAZIO, Schayra Minine et al. Intestinal parasites in a quilombola community of the Northern State of Espírito Santo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, n. 3, p. 179-183, 2013.

DESOTI, Vânia Cristina et al. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. *Marine drugs*, v. 10, n. 8, p. 1631-1646, 2012.

DE MEDEIROS, Mário Luan Silva et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. *International journal of biological macromolecules*, 2017.

DE OLIVEIRA, Sandra Maximiano et al. Intestinal parasites infection: protective effect in rheumatoid arthritis?. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*, 2016.

DE OLIVEIRA, Rosimeire Nunes et al. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology*, v. 139, p. 63-72, 2014.

DIAZ, S. Anaid; VINEY, Mark. The evolution of plasticity of dauer larva developmental arrest in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecology and evolution*, v. 5, n. 6, p. 1343-1353, 2015.

DODD, William et al. A Damage Sensor Associated with the Cuticle Coordinates Three Core Environmental Stress Responses in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 208, n. 4, p. 1467-1482, 2018.

EL-SHERBINI, Gehad T.; OSMAN, Samir M. Anthelmintic activity of unripe *Mangifera indica* L.(Mango) against *Strongyloides stercoralis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 2, n. 5, p. 401-409, 2013.

EVANS, A. A. F.; PERRY, R. N.; CROLL, N. A. *The Organization of Nematodes*. ed. Croll NA, Academic Press, London, New York and San Francisco, p. 383-424, 1976.

FENICAL, William. HALOGENATION IN THE RHODOPHYTA1, 2 A REVIEW. *Journal of Phycology*, v. 11, n. 3, p. 245-259, 1975.

FERRAZ, L. C. Sociedade Brasileira de Nematologia. Disponível em <http://nematologia.com.br/wp-content/uploads/2011/09/oque.pdf> - Acesso em 17 jan. 2018.

FERREIRA, L. E. et al. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L.(Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental parasitology*, v. 134, n. 3, p. 327-332, 2013.

FONSECA, Eduardo Oyama Lins et al. Prevalência e fatores associados às geo-helmintíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. 2010.

FORTES, Fernanda S.; MOLENTO, Marcelo B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 12, p. 1391-1402, 2013.

FRITZ, Julie-Anne; BEHM, Carolyn A. CUTI-1: A novel tetraspan protein involved in *C. elegans* CUTicle formation and epithelial integrity. *PLoS One*, v. 4, n. 4, p. e5117, 2009.

FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technic 3 th edition. New York: Wiley-Liss, Inc; 1994.

GEERTS, Stanny; GRYSEELS, Bruno. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clinical microbiology reviews*, v. 13, n. 2, p. 207-222, 2000.

GENNARI, S. M.; PENA H.F.J.; BLASQUES L.S. Frequência de ocorrência de parasitos gastrintestinais em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo, 2001.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, Filiberto et al. Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of *Giardia lamblia*. *Acta tropica*, v. 172, p. 113-121, 2017.

HARVEY, J. B.; ROBERTS, J. M.; SCHANTZ, P. M. Survey of veterinarians' recommendations for treatment and control of intestinal parasites in dogs: public health implications. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 199, n. 6, p. 702-707, 1991.

HOLDEN-DYE, Lindy; WALKER, R. Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, p. 1-29, 2014.

HOLDEN-DYE, Lindy; WALKER, Robert J. Anthelmintic drugs. *WormBook*, v. 2, p. 1-13, 2007.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2013. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014.

IGBAL, S. et al. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition) 2017, Pages 113–119-Volume 3*

IGLESIAS, L. E. et al. Impacto ambiental de la Ivermectina eliminada por bovinos tratados en otoño, sobre la coprofauna y la degradación de la materia fecal en pasturas (Tandil, Argentina). *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, v. 34, n. 3, p. 83-103, 2005.

JOHNSTONE, Iain L. The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a complex collagen structure. *Bioessays*, v. 16, n. 3, p. 171-178, 1994.

JOHNSTONE, Iain L. Cuticle collagen genes: expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Genetics*, v. 16, n. 1, p. 21-27, 2000.

KAMADA, Takashi; PHAN, Chin-Soon; VAIRAPPAN, Charles Santhanaraju. New anti-bacterial halogenated tricyclic sesquiterpenes from Bornean *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas. *Natural product research*, p. 1-8, 2017.

KAPLAN, Ray M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in parasitology*, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KLASS, Michael; WOLF, Nurit; HIRSH, David. Development of the male reproductive system and sexual transformation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, v. 52, n. 1, p. 1-18, 1976.

KÖHLER, Peter. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International journal for parasitology*, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001

KOKKOTOU, Katerina et al. An integrated approach using UHPLC–PDA–HRMS and 2D HSQC NMR for the metabolic profiling of the red alga *Laurencia*: Dereplication and tracing of natural products. *Phytochemistry*, v. 108, p. 208-219, 2014.

KONG, Cin; ENG, Su-Anne; LIM, Mei-Perng; NATHAN, Sheila. Beyond Traditional Antimicrobials: A *Caenorhabditis elegans* Model for Discovery of Novel Anti-infectives, 2016
König, GM; Wright, AD. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the red alga *Laurencia obtusa*. *Planta Med.* 1997, 63, 186–187.

KRAMER, James M. Genetic analysis of extracellular matrix in *C. elegans*. *Annual review of genetics*, v. 28, n. 1, p. 95-116, 1994.

LEE, D. L. The structure and composition of the helminth cuticle. *Advances in parasitology*, v. 4, p. 187-254, 1967.

MACHADO, Fernanda L. da S. et al. Biological activity of the secondary metabolite from marine algae of the genus *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 3, p. 441-452, 2010.

MACHADO, Fernanda LS et al. Geographic Distribution of Natural Products Produced by the Red Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Chemistry & biodiversity*, v. 13, n. 7, p. 845-851, 2016.

MACHADO, FL da S. et al. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Rev Bras Farmacogn*, v. 20, n. 3, p. 441-452, 2010.

MANKE, Mahesh Bandappa; DHAWALE, Shashikant Chaburao; JAMKHANDE, Prasad Govindrao. Helminthiasis and medicinal plants: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 5, n. 3, p. 175-180, 2015.

MARGIS, R.; BOROJEVICH, R. Quantification of attached cells in tissue cultures plates and microcarries. *Analytical Biochemistry*, v.181, p.209-211, 1989.

MAUPAS, E. Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie expérimentale et générale*, v. 8, p. 463-624, 1901.

MEDINA, José Manuel Aparicio et al. Impacto de la ivermectina sobre el ambiente. *La Calera*, v. 11, n. 17, p. 64-66, 2012.

MEISEL, Joshua D.; KIM, Dennis H. Behavioral avoidance of pathogenic bacteria by *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Immunology*, v. 35, n. 10, p. 465-470, 2014.

MOLINSKI, Tadeusz F. et al. Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, v. 8, n. 1, p. 69, 2009.

NASCIMENTO, Érica Maria et al. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. *Ciência Rural*, v. 39, n. 3, 2009.

OBATA, Y.; OBATA, S. Fukushi. Fukushi had pointed out the presence of a sesquiterpene hydrocarbon: *J. Agricult. Chem. Soc. Japan*, v. 27, p. 331, 1953.

OLIVEIRA FILHO, Eurico Cabral de. *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. 1977. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA-MENEZES, A. et al. Comparative analysis of a chemotherapy effect on the cuticular surface of *Wuchereria bancrofti* adult worms in vivo. *Parasitology research*, v. 101, n. 5, p. 1311-1317, 2007.

ÔMURA, Satoshi; CRUMP, Andy. The life and times of ivermectin—a success story. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 12, p. 984-989, 2004.

PAGE, A. P.; JOHNSTONE, I. L. The cuticle (2007), *Worm-Book*, ed. The *C. elegans* Research Community. *WormBook*.

PAGE, Antony P. et al. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target?. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 2, p. 133-141, 2014.

PEIXOTO, Christina A.; KRAMER, James M.; DE SOUZA, Wanderley. *Caenorhabditis elegans* cuticle: a description of new elements of the fibrous layer. *The Journal of parasitology*, v. 83, n. 3, p. 368-372, 1997.

PEREIRA, Renato Crespo; TEIXEIRA, Valéria Laneuville. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. *Quim Nova*, v. 22, p. 369-374, 1999.

PLENEFISCH, John D.; ZHU, Xiaoping; HEDGECOCK, Edward M. Fragile skeletal muscle attachments in dystrophic mutants of *Caenorhabditis elegans*: isolation and characterization of the *mua* genes. *Development*, v. 127, n. 6, p. 1197-1207, 2000.

PHIRI, A. M. et al. A novel assay for the detection of anthelmintic activity mediated by cuticular damage to nematodes: validation on *Caenorhabditis elegans* exposed to cysteine proteinases. *Parasitology*, v. 144, n. 5, p. 583-593, 2017.

PIÑA VÁZQUEZ, Denia María. Potencial antihelmíntico de extractos de plantas silvestres y cultivadas mediante el uso del nematodo modelo *Caenorhabditis elegans*. 2014. Tese de Doutorado.

RIDDLE, Donald L. et al. Introduction. In: *C. elegans* II. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, 393p, cap12.

RIDDLE, D. L.; BIRD, A. F. Responses of the plant parasitic nematodes *Rotylenchulus reniformis*, *Anguina agrostis* and *Meloidogyne javanica* to chemical attractants. *Parasitology*, v. 91, n. 1, p. 185-195, 1985.

RIST, Cassidy L. et al. The burden of livestock parasites on the poor. *Trends in parasitology*, v. 31, n. 11, p. 527-530, 2015.

ROBERTS, L. S.; JANOVY, J.; SCHMIDT, G. D. Gerald D. Schmidt and Larry S. Roberts' foundations of parasitology. London, UK: Brown, 1996.

ROEBER, Florian; JEX, Aaron R.; GASSER, Robin B. Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants. A turning point. *Adv Parasitol*, v. 832013, p. 267-333, 2013.

ROY, Bishnupada; DASGUPTA, Shyamashree; TANDON, Veena. Ultrastructural observations on tegumental surface of *Raillietina echinobothrida* and its alterations caused by root-peel extract of *Millettia pachycarpa*. *Microscopy research and technique*, v. 71, n. 11, p. 810-815, 2008.

ROY, Bishnupada; DASGUPTA, Shyamashree; TANDON, Veena. Ultrastructural observations on *Fasciolopsis buski* and its alterations caused by shoot extract of *Alpinia nigra*. *Microscopy research and technique*, v. 72, n. 2, p. 61-66, 2009.

SALVADOR-NETO, Orlando et al. Larvicidal potential of the halogenated sesquiterpene (+)-obtusol, isolated from the alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodomelaceae), against the Dengue vector mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera: Culicidae). *Marine drugs*, v. 14, n. 2, p. 20, 2016.

SANGSTER, N. C.; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today*, v. 15, n. 4, p. 141-146, 1999.

SANGSTER, N. C. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International journal for parasitology*, v. 29, n. 1, p. 115-124, 1999.

SANT'ANNA, Viviane et al. Ultrastructural study of effects of alkylphospholipid analogs against nematodes. *Experimental parasitology*, v. 187, p. 49-58, 2018.

SANT'ANNA, Viviane; VOMMARO, Rossiane C.; DE SOUZA, Wanderley. *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, 2013.

SANT'ANNA, Viviane; DE SOUZA, Wanderley; VOMMARO, Rossiane C. Anthelmintic effect of herbicidal dinitroanilines on the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Experimental parasitology*, v. 167, p. 43-49, 2016.

SANTOS, Adriana Oliveira dos et al. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Marine drugs*, v. 8, n. 11, p. 2733-2743, 2010.

SAPIO, Maria Rosaria et al. The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, v. 282, n. 1, p. 231-245, 2005.

SCHEUER, Paul J. (Ed.). *Marine natural products: chemical and biological perspectives*. Academic Press, 2013.

SEBAUGH, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics*, v. 10, n. 2, p. 128-134, 2011.

School of Biosciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia

SHARIF, Nadia et al. Prolific Anticancer Bioactivity of Algal Extracts. *cell*, v. 3, n. 4, p.8.
Sims, JJ; Lin, GHY; Wing, RM. Marine natural products: Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tetrahedron Lett.* 1974, 39, 3487–3490.

SOUSA, R. G. et al. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 15, n. 2, p.287-292, 2013.

STEIN, Erika M. et al. Antischistosomal activity from Brazilian marine algae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 6, p. 663-667, 2015.

STEIN, Lincoln et al. WormBase: network access to the genome and biology of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 1, p. 82-86, 2001.

SUKONTASON, Kom et al. Scanning electron microscopic observations on advanced third-stage larva of *Gnathostoma spinigerum* after in vitro exposure to albendazole sulphoxide. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmai het thangphaet*, v. 83, n. 4, p. 426-432, 2000.

TEIXEIRA, Valéria L.; KELECOM, Alphonse; GOTTLIEB, Otto R. Produtos naturais de algas marinhas. *Quim Nova*, v. 14, p. 83-90, 1991.

TRENT, Carol; TSUNG, Nancy; HORVITZ, H. Robert. Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 104, n. 4, p. 619-647, 1983.

VAN VEEN, TW Schillhorn. Sense or nonsense? Traditional methods of animal parasitic disease control. *Veterinary parasitology*, v. 71, n. 2, p. 177-194, 1997.

VEIGA-SANTOS, P. et al. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology*, v. 137, n. 11, p. 1661-1670, 2010.

VEIGA-SANTOS, P. et al. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology*, v. 137, n. 11, p. 1661-1670, 2010.

VIEIRA, L.S. ; CAVALCANTE, A.C.R.; PEREIRA, M.F.; DANTAS, L.B.; XIMENES, L.J.F (1999). *Revue Medicine Veterinaire*, v.150, n.5, p.447-52.

VIEIRA, L. da S. Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Embrapa Caprinos e Ovinos-Documentos (INFOTECA-E)*, 2005.

VICTORIA, Jairo; EN EPIDEMIOLOGÍA, Magíster. Uso de ivermectina en niños. *Dermatol Pediatr Lat* 2003; 1 (1): 61, v. 65, 2003.

WANG, Peiqi et al. Natural products as modulator of autophagy with potential clinical prospects. *Apoptosis*, p. 1-32, 2016.

YAO, Hong et al. The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, p. 1-20, 2016.

ZHANG, Yun; LU, Hang; BARGMANN, Cornelia I. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 438, n. 7065, p. 179, 2005.