

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Aline Franzen da Silva

**Avaliação fármaco-toxicológica da molécula JM-20 em *Caenorhabditis
elegans***

Santa Maria, RS

2023

Aline Franzen da Silva

Avaliação fármaco-toxicológica da molécula JM-20 em *Caenorhabditis elegans*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Profissional em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientador Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

**Santa Maria, RS
2023**

Aline Franzen da Silva

**AVALIAÇÃO FÁRMACO-TOXICOLÓGICA DA MOLÉCULA JM-20 EM
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Profissional em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Aprovada em 17 de outubro de 2023:

Félix Alexandre Antunes Soares -Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Denis Broock Rosemberg – Dr. (UFSM)

Roberta Schmatz – Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

FRANZEN DA SILVA, ALINE

Avaliação fármaco-toxicológica da molécula JM-20 em
Caenorhabditis elegans / ALINE FRANZEN DA SILVA.- 2023.
44 p.; 30 cm

Orientador: FELIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2023

1. Neurotoxicologia 2. Modelos alternativos 3.
Screening de moléculas 4. Caenorhabditis elegans I.
ANTUNES SOARES, FELIX ALEXANDRE II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a todas as pessoas cuja presença foi fundamental para a realização desse trabalho.

À minha mãe, o meu profundo agradecimento pelo amor incondicional dedicado a mim desde meu primeiro segundo de vida. Seu suporte emocional e financeiro foram fundamentais para possibilitar, desde sempre, minha busca pelo conhecimento.

Às minhas queridas irmãs, Raquel e Ticiane, expresso minha gratidão por serem meu exemplo desde cedo, me incentivando a ser sempre melhor e a nunca parar de estudar.

Agradeço ao meu orientador, Professor Félix, por ter me recebido em seu laboratório de forma tão acolhedora, fazendo com que eu me sentisse parte da família que o Lab Félix sempre foi. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma não acreditava.

Agradeço às minhas queridas amigas e colegas de laboratório da “velha guarda”, Marina, Letícia, Dani, Débora, Andrezza. Vocês, sem dúvida, foram fonte de inspiração para que eu continuasse na pesquisa. Serei sempre grata por toda parceria e amizade ao longo dos anos em que estivemos juntas.

Aos meus queridos colegas que ainda mantêm convivência diária comigo - Lari Marafiga, Fabi, Tássia e Marcell– meu sincero agradecimento. A troca de aprendizado entre nós foi fundamental durante todo esse processo, e vocês sempre serão importantes pra mim.

Às minhas ICs amadas – Andri, Lari e Manu – agradeço imensamente por colorirem meus dias. Saibam que estou sempre à disposição para apoiá-las no que precisarem.

Agradeço meus amigos farmacêuticos que sempre se fazem presente, torcendo por mim e celebrando minhas conquistas: Ana, Igor e Guilherme. O apoio de vocês é um impulso valioso em direção ao meu melhor.

Um agradecimento especial a minha amiga e colega Tássia, que esteve comigo me dando todo o suporte necessário no desfecho dessa jornada. Seu apoio foi de extrema importância para conclusão deste trabalho.

Agradeço também ao meu namorado Samuel, que nessa reta final de concretização do mestrado esteve ao meu lado me dando força para seguir em frente.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica pela contribuição na minha formação.

Aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES, pela bolsa de estudo e recursos financeiros concedidos.

Muito obrigada a todos!

*“O principal objetivo da ciência não é abrir a porta para a sabedoria infinita, mas
recuar os limites do erro infinito”*

Bertolt Brecht – A vida de Galileu

RESUMO

AVALIAÇÃO FARMACO-TOXICOLÓGICA DA MOLÉCULA JM-20 EM *Caenorhabditis elegans*

AUTORA: Aline Franzen da Silva

ORIENTADOR: Félix Alexandre Antunes Soares

Com a descoberta de novas moléculas com potencial farmacêutico, há o surgimento de estudos que exploram diferentes mecanismos de ação e aspectos toxicológicos. O 3-etoxicarbonil-2-metil-4-(2-nitrofenil)-4,11-di-hidro-1H-pirido [2,3-b] [1,5] benzodiazepina (JM-20) é um composto híbrido, derivado de 1,5-benzodiazepinas e se diferencia estruturalmente pela adição de 1,4-di-hidropiridina ligada ao anel benzodiazepínico. Essa modificação confere a essa molécula um potencial de atividade neuroprotetora, antioxidante e ansiolítica. Dado o seu potencial como uma molécula multialvo promissora, são necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento sobre seus mecanismos de ação. Neste estudo, foi utilizado o modelo experimental *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) para investigar os efeitos do tratamento crônico com JM-20. Animais da cepa selvagem (N2) e mutantes CB156 (*unc-25*) foram submetidos a tratamento crônico com concentrações de 0 a 100 μ M de JM-20. Os resultados indicaram que o JM-20 não induz aumento da taxa de mortalidade, mas nas concentrações mais altas avaliadas, houve um atraso no desenvolvimento dos vermes após 48 horas de exposição. As análises comportamentais revelaram uma diminuição no ciclo de defecação. Além disso, observou-se um aumento na atividade locomotora e uma redução na postura de ovos após o tratamento com JM-20. Na avaliação dos comportamentos de locomoção e defecação em mutantes com níveis reduzidos de GABA (*unc-25*), o efeito causado pelo JM-20 foi abolido, sugerindo a modulação GABAérgica exercida pelo composto. Adicionalmente, o JM-20 apresentou efeito semelhante ao Diazepam nos parâmetros comportamentais observados. Na análise computacional, foi observado que o JM-20 se liga ao sítio do receptor GABA_A de maneira muito semelhante ao Diazepam. Em resumo, este estudo oferece uma compreensão mais aprofundada dos efeitos do JM-20 em *C. elegans*, destacando seus efeitos no sistema GABAérgico nesse modelo animal.

Palavras-chaves: benzodiazepínicos; JM-20; nematoide; comportamento, screening, toxicologia.

ABSTRACT

PHARMACO-TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE JM-20 MOLECULE IN *Caenorhabditis elegans*

AUTHOR: Aline Franzen da Silva

ADVISOR: Félix Alexandre Antunes Soares

With the discovery of new molecules with pharmaceutical potential, studies examining different mechanisms of action and toxicological aspects emerge. The 3-ethoxycarbonyl-2-methyl-4-(2-nitrophenyl)-4,11-dihydro-1H-pyrido[2,3-b][1,5]benzodiazepine (JM-20) is a hybrid compound derived from 1,5-benzodiazepines, structurally distinguished by the addition of 1,4-dihydropyridine linked to the benzodiazepine ring. This modification gives this molecule the potential for neuroprotective, antioxidant, and anxiolytic activity. Given its potential as a promising multi-target molecule, further studies are needed to deepen the understanding of its mechanism of action. In this study, the *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) experimental model was used to investigate the effects of chronic treatment with JM-20. Animals from the wild-type strain (N2) and CB156 mutants (*unc-25*) were subjected to chronic treatment with concentrations ranging from 0 to 100 μM of JM-20. The results indicated that JM-20 did not result in mortality, but at the higher concentrations evaluated, there was a delay in worm development after 48 hours of exposure. Behavioral analyses revealed a decrease in the defecation cycle. Furthermore, an increase in locomotor activity and a reduction in egg laying were observed after treatment with JM-20. In the evaluation of locomotion and defecation behaviors in mutants with reduced levels of GABA (*unc-25*), the effect caused by JM-20 was abolished, suggesting the GABAergic modulation exerted by the compound. Additionally, JM-20 exhibited a similar effect to Diazepam in the observed behavioral parameters. Computational analysis revealed that JM-20 binds to the GABAA receptor site very similarly to Diazepam. In summary, this study provides a deeper understanding of the effects of JM-20 in *C. elegans*, highlighting its effects on the GABAergic system in this animal model.

Keywords: benzodiazepines; JM-20; nematode; behavior, screening, toxicology.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do JM-20.....	16
Figura 2 – Receptor GABA _A e suas subunidades.....	17
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	21
Figura 4 – Síntese de GABA e neurônios GABAérgicos em <i>C. elegans</i>	22
Figura 5 – Ação do JM-20 no nematodeo <i>Caenorhabditis elegans</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDZ	Benzodiazepínico
BIC	Bicuculina
CAT	Catalase
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
DZP	Diazepam
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase
MDA	Malondialdeído
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	Pentilenotetrazol
REA	Relação Estrutura Atividade
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superoxido dismutase

Sumário

APRESENTAÇÃO	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. JUSTIFICATIVA	25
4. ARTIGO PUBLICADO	26
FIGURE SUPPLEMENTARY SUBTITLES:.....	36
5. CONCLUSÃO	39
GRAPHICAL ABSTRACT.....	40
6. PERSPECTIVAS	40
7. BIBLIOGRAFIA	41

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho se encontra apresentado da seguinte forma: uma breve introdução contendo informações sobre mecanismos de desordens do Sistema Nervoso Central, e importância da busca por tratamentos inovadores para esse tipo de desordem, com enfoque na relevância de novas moléculas multialvo. Também na introdução, encontra-se descrito sobre a utilização de *Caenorhabditis elegans* como modelo de *screening* de novas moléculas e funcionamento dos sistemas neuronais no animal.

Logo após, encontra-se os objetivos do trabalho realizado. Na sequência, uma breve justificativa do presente estudo.

Os itens materiais e métodos, resultados e discussão se encontram apresentados na forma de artigo científico publicado na revista *Neurotoxicology*, em 2022.

Posteriormente encontra-se uma breve conclusão do estudo, seguido das perspectivas futuras.

Por fim, as referências das citações feitas ao longo do texto da introdução, uma vez que o artigo científico contém suas próprias referências.

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Central (SNC) é uma estrutura extremamente crucial para o funcionamento do organismo humano, composto por uma complexa rede de comunicação que desempenha um papel essencial na regulação e coordenação de praticamente todos os aspectos da funcionalidade biológica humana (GIOVANNONI; QUINTANA, 2020). Para exercer suas funções, o SNC age por meio da integração e processamento de informações, realizadas principalmente através de sinapses mediadas por neurônios, que constituem as unidades básicas e fundamentais deste sistema neural (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016). Os neurônios, células altamente diferenciadas e especializadas que compõem a unidade celular básica do SNC, desempenham um papel fundamental na transmissão de sinais químicos e elétricos entre as diferentes regiões anatômicas e funcionais do sistema nervoso, possibilitando a comunicação eficiente e coordenada entre os órgãos e sistemas do corpo humano (GOSSELET; LOIOLA; ROIG; ROSELL *et al.*, 2021). Essa rede sináptica é essencial para a coordenação das respostas adaptativas do organismo diante das variadas demandas ambientais e fisiológicas, garantindo a homeostase e o adequado funcionamento (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016).

O adequado funcionamento das funções cerebrais depende da manutenção do equilíbrio entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias (DUMAN; SANACORA; KRYSTAL, 2019). As neurotransmissões excitatórias, mediadas principalmente pelo neurotransmissor glutamato, estimulam a atividade neuronal e desempenham um papel essencial na sinalização e transmissão de impulsos nervosos. Por outro lado, as neurotransmissões inibitórias, predominantemente mediadas pelo neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), inibem a atividade neuronal regulando e modulando-as. Esse equilíbrio é essencial para garantir um funcionamento cerebral adequado, e pode ser afetado por uma variedade de fatores, incluindo a concentração de neurotransmissores, a atividade dos receptores e transportadores, e a interação entre diferentes tipos de neurônios (SEARS; HEWETT, 2021). Além disso, o desbalanço da homeostase dos processos de sinalização neuronal pode afetar negativamente o funcionamento do SNC e ocasionar-lhe diferentes tipos de desordens, as quais envolvem uma complexa rede de eventos interligados, podendo resultar em danos neurais e morte celular (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; REYES; DOMINGUEZ *et al.*, 2013).

Um exemplo desse tipo de cenário é o que ocorre na lesão cerebral isquêmica, caracterizada pela interrupção do fluxo sanguíneo, que resulta na morte neuronal em regiões específicas do cérebro ocasionada pela desregulação do equilíbrio entre as transmissões sinápticas excitatórias e inibitórias (E/I). Nesse tipo de lesão cerebral ocorre uma hiperestimulação da neurotransmissão excitatória, aumentando os níveis de glutamato na fenda sináptica, que acaba por hipersensibilizar os seus receptores, causando desbalanço de íons dentro da célula, desempenhando um papel chave no processo de neurotoxicidade, uma das principais causas do dano neuronal na isquemia (AMANTEA; BAGETTA, 2017).

Outro cenário onde ocorre o desequilíbrio entre as funções excitatórias e inibitórias é nos quadros de epilepsia, uma doença neurológica caracterizada por convulsões (FALCO-WALTER, 2020). Por ser o principal neurotransmissor inibitório do SNC, o GABA desempenha função vital para a manutenção do equilíbrio celular. Dentre seus componentes celulares, sabe-se que existem dois tipos principais de receptores GABAérgicos: GABA_A e GABA_B. Os receptores GABA_A são canais iônicos que exercem rápido efeito inibitório pelo aumento do influxo de cloreto nas células. Essa entrada dos íons de cloreto hiperpolariza a célula, tornando-a ainda mais negativa em relação ao seu potencial de repouso, dificultando a geração de um potencial de ação posterior, o qual é fundamental para a neurotransmissão excitatória (SALLARD; LETOURNEUR; LEGENDRE, 2021). Na epilepsia, a neurotransmissão inibitória mediada por GABA está comprometida, fazendo com que haja um aumento das neurotransmissões excitatórias, resultando em episódios de convulsão. Os medicamentos que intensificam a inibição mediada pelo GABA, como os benzodiazepínicos, são utilizados na clínica como anticonvulsivantes para tratar essa condição (AKYUZ; POLAT; EROGLU; KULLU *et al.*, 2021).

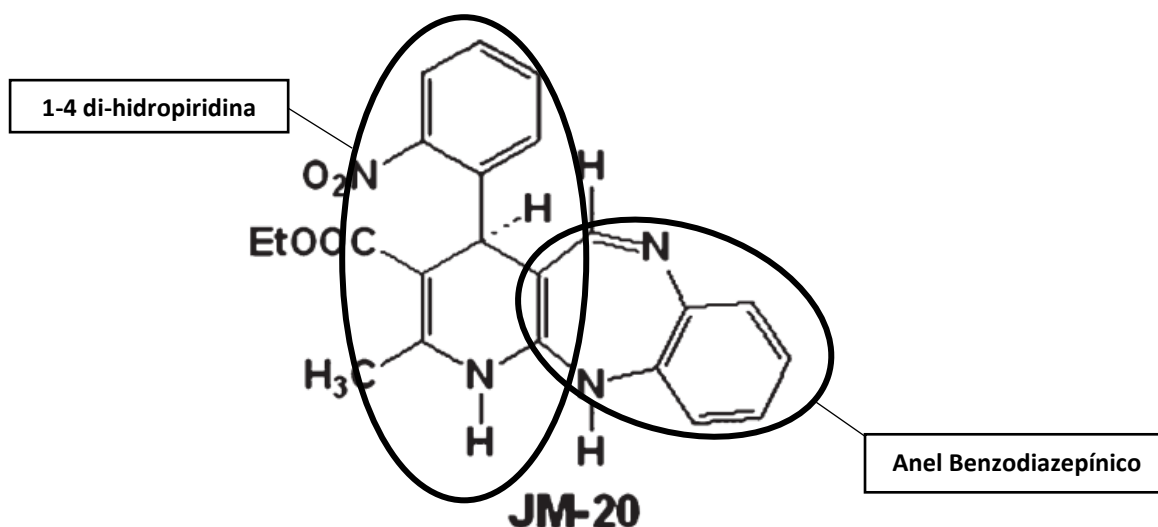
Na cascata de sinalização via receptores sabe-se que o cálcio (Ca²⁺) é um íon crucial na regulação do equilíbrio entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias, ativando processos intracelulares de sobrevivência celular (BRAVO-SAGUA; PARRA; LOPEZ-CRISOSTO; DIAZ *et al.*, 2017). Contudo, quando ocorre uma hiperestimulação dos receptores, há um aumento excessivo de cálcio intracelular, e é quando ocorre a excitotoxicidade gerada por Ca²⁺, levando à ativação de vias celulares que podem causar danos e até a morte dessas (BURGOS; BARAT; RAMIREZ, 2000). Tal toxicidade gerada pelo Ca²⁺ pode ocorrer através da hiperestimulação dos receptores de glutamato,

especialmente os receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), por serem canais de cálcio dependentes de glutamato. Sabe-se que a excitotoxicidade gerada por Ca^{2+} é uma característica comum em várias condições patológicas, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson e acidente vascular cerebral (AVC); ressaltando a importância de um equilíbrio adequado na regulação desse íon para a saúde neuronal e funcionalidade do SNC (VERMA; LIZAMA; CHU, 2022).

Sabe-se que atualmente a estratégia convencional para tratar essas e tantas outras patologias prioriza tratamentos potentes e específicos para um único alvo, com o objetivo de minimizar efeitos colaterais (TALEVI, 2015). No entanto, essa abordagem por vezes não apresenta correlação com a eficácia *in vivo*, uma vez que grande parte das doenças geralmente são multifatoriais. Nesse contexto, o emprego de moléculas com a capacidade de interagir com múltiplos alvos farmacológicos representa uma promissora abordagem para prevenção e tratamento de distúrbios envolvendo múltiplos mecanismos etiológicos, como os problemas envolvendo a excitotoxicidade glutamatérgica (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; REYES; DOMINGUEZ *et al.*, 2013). Os medicamentos considerados “*multi-target*” possuem algumas vantagens em comparação com terapias combinadas, incluindo a farmacocinética mais previsível, menor probabilidade de interações medicamentosas e maior adesão dos pacientes (MORPHY; RANKOVIC, 2005).

Com o objetivo de desenvolver um fármaco que pudesse atuar simultaneamente em diferentes alvos farmacológicos e que fosse possível de ser utilizado para o tratamento de distúrbios do SNC, a molécula 3-etoxicarbonil-2-metil-4-(2-nitrofenil)-4,11-dihidro-1Hpirido [2,3-b] [1,5] benzodiazepina (JM-20) foi desenvolvida recentemente de forma sintética (Figura 1).

Figura 1. Estrutura molecular de JM-20



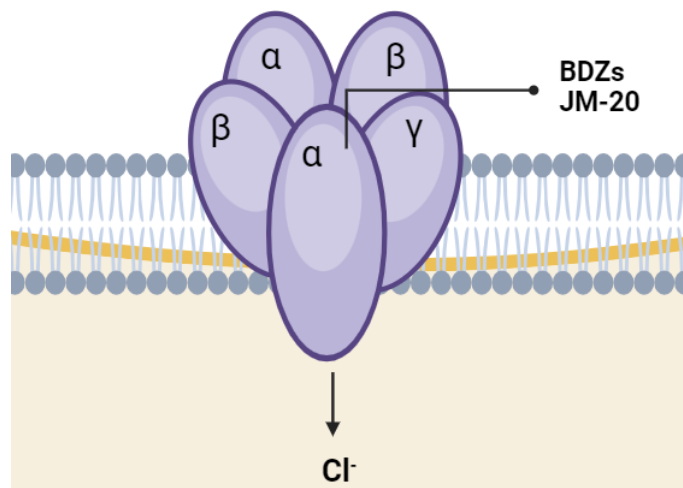
Fonte: (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; REYES; DOMINGUEZ *et al.*, 2013)

Derivado da família 1,5-benzodiazepina, o JM-20 apresenta uma fração de 1,4 dihidropiridina inserida em seu anel benzodiazepínico, o que lhe confere capacidade de ação nos canais de cálcio e simultaneamente nos receptores GABA_A (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; REYES; DOMINGUEZ *et al.*, 2013). O JM-20 apresenta semelhança estrutural entre a sua molécula e a de fármacos já conhecidos e utilizados na clínica, como o Diazepam® e a Nifedipina®, que pertencem às classes dos benzodiazepínicos e bloqueadores de cálcio, respectivamente.

Os benzodiazepínicos são conhecidos por potencializar a eficácia da neurotransmissão inibitória GABAérgica através de uma modulação alostérica dos receptores GABA_A, sem ativar diretamente esses receptores ou abrir os canais de cloreto associados (AKYUZ; POLAT; EROGLU; KULLU *et al.*, 2021). Eles não substituem a ligação do neurotransmissor GABA, mas ao se ligarem a locais específicos desses receptores potencializam a ação da neurotransmissão GABA resultando em um aumento da inibição sináptica (Fig 1) (ATKIN; COMAI; GOBBI, 2018). Estudos recentes destacam tal interação alostérica como fundamental para a eficácia terapêutica dos benzodiazepínicos em condições clínicas. Tais medicamentos são amplamente utilizados para diversos fins terapêuticos, incluindo ansiolíticos, sedativos, relaxantes musculares e anticonvulsivantes (ATKIN; COMAI; GOBBI, 2018),(SILLS; ROGAWSKI, 2020). No entanto, o uso terapêutico dos derivados benzodiazepínicos não se limita a condições de

ansiedade e estresse, mas se estende também a aplicações inovadoras, como a neuroproteção (DOMINGUINI; STECKERT; MICHELS; SPIES *et al.*, 2021)

Figura 2: Receptor GABA_A e suas subunidades



Fonte: A autora

Os fármacos da classe das dihidropiridinas, como a Nifedipina®, são utilizados no tratamento de condições cardiovasculares, como hipertensão arterial e angina (A; MAKAM, 2022). O mecanismo de ação desses fármacos reside no bloqueio seletivo dos canais de Ca²⁺ tipo L encontrados nas células musculares lisas do coração e dos vasos sanguíneos, que ao serem bloqueados induzem a redução da entrada de íons Ca²⁺ nas células musculares lisas, resultando na diminuição da quantidade desse íon disponível para a contração muscular (A; MAKAM, 2022)

Por apresentar em sua composição ambas as estruturas químicas, a porção dihidropiridina e o anel benzodiazepínicos, emerge a hipótese de que o JM-20 poderia também conter propriedades neuroprotetoras. Já que a sua primeira porção estrutural apresenta efeitos favoráveis associados ao bloqueio dos canais de cálcio na modulação da excitabilidade neuronal, e sua segunda porção estrutural apresenta modulação positiva no sistema GABAérgico otimizando a eficácia da neurotransmissão inibitória.

Estudos realizados após o desenvolvimento do JM-20 foram projetados para avaliar sua ação e efeitos, bem como os possíveis mecanismos de ação desse novo composto. Dentre esses estudos, o JM-20 apresentou efeitos em diferentes alvos que são objetos de

estudos dos mecanismos causadores de danos cerebrais, como o estresse oxidativo (NUNEZ-FIGUEREDO; PARDO-ANDREU; RAMIREZ-SANCHEZ; DELGADO-HERNANDEZ *et al.*, 2014), neuroinflamação (RAMIREZ-SANCHEZ; SIMOES PIRES; NUNEZ-FIGUEREDO; PARDO-ANDREU *et al.*, 2015), disfunção mitocondrial (NUNEZ-FIGUEREDO; RAMIREZ-SANCHEZ; DELGADO-HERNANDEZ; PORTO-VERDECIA *et al.*, 2014) e excitotoxicidade glutamatérgica (NUNEZ-FIGUEREDO; PARDO ANDREU; OLIVEIRA LOUREIRO; GANZELLA *et al.*, 2015). Em avaliações experimentais, o JM-20 demonstrou conservar um perfil ansiolítico similar ao Diazepam e outros derivados de benzodiazepínicos, através da observação do comportamento de camundongos em testes como o campo aberto e o labirinto em cruz elevada, sendo estes capazes de avaliar ansiedade nesses animais. Adicionalmente, o JM-20 também exibiu a capacidade de atenuar comportamentos agressivos em camundongos sujeitos a isolamento social, provavelmente devido à sua influência positiva na modulação dos receptores GABAérgicos (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; REYES; DOMINGUEZ *et al.*, 2013). Ainda, em experimentos de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos, o JM-20 revelou um potencial neuroprotetor significativo, manifestado pelo aumento da latência para o início das crises convulsivas e pela melhoria da taxa de sobrevivência nesses animais, sugerindo assim que a adição do grupamento dihidropiridina não interfere na atividade GABAérgica dessa molécula (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; REYES; DOMINGUEZ *et al.*, 2013).

Outros estudos avaliando as propriedades antioxidantes do JM-20 também foram realizados, onde tal composto demonstrou capacidade de inibir a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em mitocôndrias e sinaptossomas. Ainda, também foi capaz de prevenir eventos prejudiciais à funcionalidade mitocondrial, como a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo C em modelos de AVC, além de também ter apresentado redução da toxicidade gerada por Ca^{2+} , bem como a atenuação de lesão isquêmica (NUNEZ-FIGUEREDO; PARDO-ANDREU; RAMIREZ-SANCHEZ; DELGADO-HERNANDEZ *et al.*, 2014).

Além disso, estudos investigando uma possível atividade neuroprotetora de JM-20 em doenças neurodegenerativas também foram realizados, como no estudo de Fonseca *et al.*, onde o JM-20 exibiu proteção às células SHSY-5Y, linhagem celular humana para neuroblastoma, contra a citotoxicidade provocada pela rotenona (inibidor do complexo I, a qual induz dano mitocondrial e estresse oxidativo, e é utilizada para simular sintomas

semelhantes a pacientes com Doença de Parkinson (DP), reduzindo assim a morte celular). Em estudos *in vivo*, o JM-20 não apenas evitou a perda de peso corporal e a mortalidade causada pela rotenona, mas também diminuiu as alterações comportamentais induzidas na atividade locomotora dos animais (FONSECA-FONSECA; WONG-GUERRA; RAMIREZ-SANCHEZ; MONTANO-PEGUERO *et al.*, 2019). Ainda, o JM-20 promoveu uma melhora no equilíbrio redox dos animais, aumentando as atividades das enzimas de ação antioxidante como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como reduziu as concentrações do biomarcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA). Adicionalmente, o JM-20 também inibiu o inchaço espontâneo mitocondrial e a dissipação do potencial de membrana em mitocôndrias isoladas do cérebro de ratos (FONSECA-FONSECA; WONG-GUERRA; RAMIREZ-SANCHEZ; MONTANO-PEGUERO *et al.*, 2019).

Além de apresentar ação em alvos celulares importantes para a sobrevivência de nossas células, o JM-20 apresentou ação protetiva contra um modelo de toxicidade induzido pela DP, interferindo e promovendo a formação de agregados menos tóxicos na formação dos agregados tóxicos de α -sinucleína (SANTOS; CARDIM-PIRES; SHVACHIY; FONSECA-FONSECA *et al.*, 2022), fortalecendo a potencialidade de ser um fármaco aplicável para o tratamento da DP. Já nas avaliações dos efeitos no modelo de Doença de Alzheimer (DA) induzido por escopolamina (indutor do aumento da atividade da enzima acetil colinesterase (AChE) e indutor de dano de memória) em ratos, a administração de uma dose única de JM-20 foi capaz de prevenir contra o dano de memória induzido por escopolamina, além de prevenir completamente a estimulação da AchE (WONG-GUERRA; JIMENEZ-MARTIN; FONSECA-FONSECA; RAMIREZ-SANCHEZ *et al.*, 2019). Para corroborar com esse resultado, estudo de D'Avila da Silva *et al.* mostrou a capacidade do JM-20 de agir na inibição de colinesterases *in vitro*. Tais achados sugerem que o JM-20 pode facilitar a transmissão colinérgica e proteger o processo de consolidação e aquisição de memória (D'AVILA DA SILVA; NOGARA; OCHOA-RODRIGUEZ; NUNEZ-FIGUEREDO *et al.*, 2020).

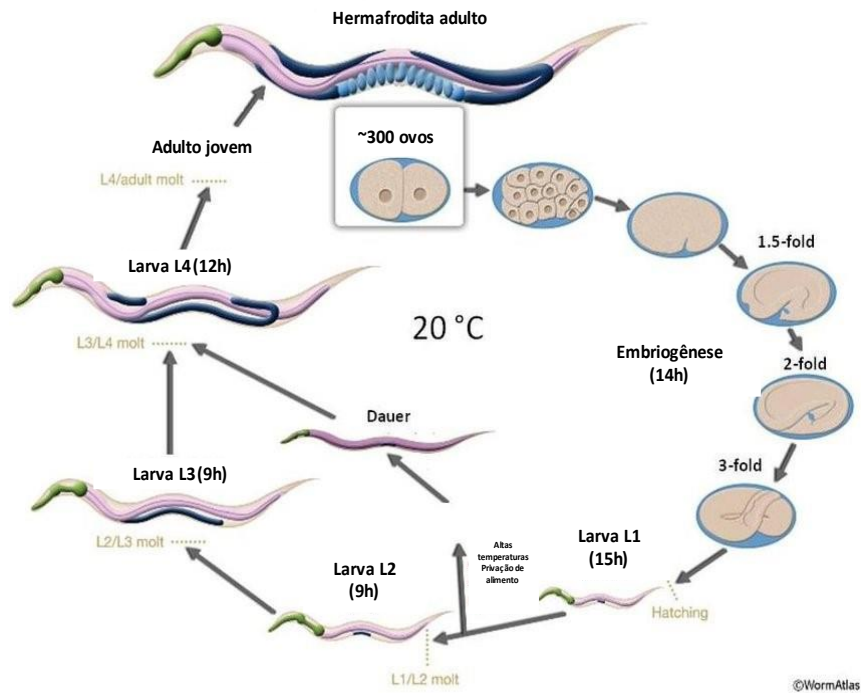
Além dos efeitos diretamente relacionados às doenças neurodegenerativas, JM-20 apresentou diversos outros potenciais benéficos, como os efeitos protetores contra a morte celular induzida pela privação de oxigênio e glicose (RAMIREZ-SANCHEZ; SIMOES PIRES; NUNEZ-FIGUEREDO; PARDO-ANDREU *et al.*, 2015), a manutenção da integridade mitocondrial e a redução do dano causado pela isquemia cerebral (NUNEZ-

FIGUEREDO; RAMIREZ-SANCHEZ; HANSEL; SIMOES PIRES *et al.*, 2014). Todos esses estudos envolvendo esse composto evidenciam a potencialidade do JM-20 como um agente neuroprotetor em diferentes distúrbios do SNC. Entretanto, estudos elucidando seu perfil toxicológico ainda são escassos, tornando necessária uma análise toxicológica dessa promissora molécula candidata a fármaco.

No presente cenário da pesquisa mundial, observa-se um crescente aumento da utilização de modelos alternativos a mamíferos, uma vez que apresentam diversos benefícios especialmente na área de desenvolvimento de novos fármacos. Tais modelos frequentemente se destacam por um custo mais acessível e viável, facilitando sua manutenção e possibilitando uma escala mais ampla de experimentos. O *Caenorhabditis elegans* é um pequeno nematódeo de vida livre, encontrado no solo de ambientes de regiões temperadas, se alimentando de bactérias e fungos (HUNT, 2017). Desde os anos 1960, estudos utilizando *C. elegans* têm ganhado crescente popularidade, especialmente nas áreas de genética e biologia molecular (BRENNER, 1974), (ARVANITIS; LI; LEE; MYLONAKIS, 2013). Esse organismo possui diversos sistemas de neurotransmissão que coordenam seus comportamentos, incluindo os sistemas glutamatérgico (BROCKIE; MARICQ, 2006), colinérgico (RAND, 2007), dopaminérgico, serotoninérgico (CHASE; KOELLE, 2007), assim como o sistema GABAérgico (JORGENSEN, 2005). O genoma de *C. elegans*, bem como suas vias metabólicas e biossintéticas, são altamente conservados em relação aos mamíferos, com uma semelhança de aproximadamente 60-80%. Com isso, o uso deste nematódeo como modelo para o estudo de doenças humanas, principalmente doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e doença de Huntington, tem ganhado destaque. (MARKAKI; TAVERNARAKIS, 2020).

Além disso, este nematódeo também tem sido amplamente utilizado por pesquisadores nas áreas de toxicologia e farmacologia, devido às numerosas possibilidades que oferece, como “screening” e avaliações toxicológicas de novas moléculas. Tanto anatomicamente quanto geneticamente, *C. elegans* possui uma simplicidade que, aliada à sua translucidez, auxiliam em estudos que envolvem desenvolvimento celular. Seu genoma é totalmente sequenciado, o que permite o estudo de genes homólogos aos mamíferos (HUNT, 2017).

Figura 3. Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*.



FONTE: Adaptado de WormAtlas:

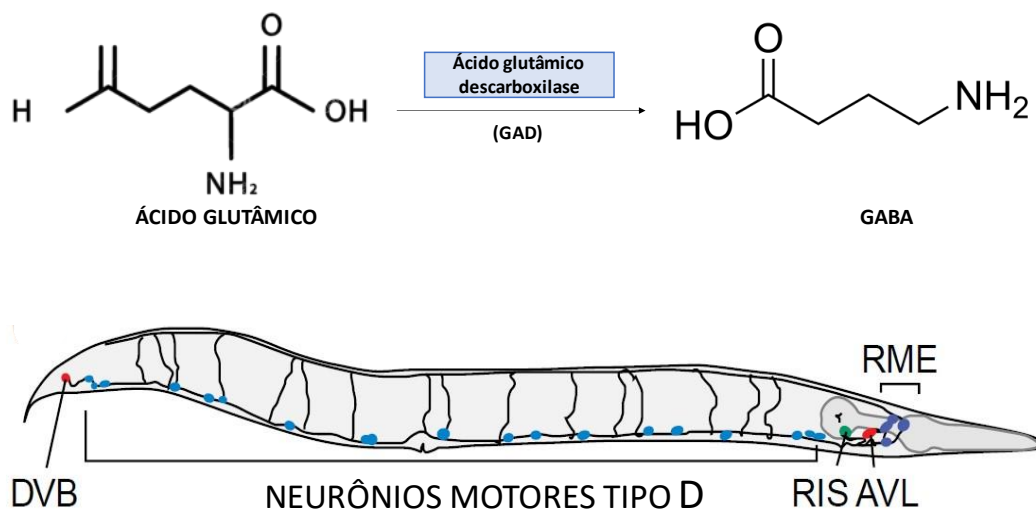
<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>

A utilização de *C. elegans* como modelo para *screening* toxicológico tem se popularizado cada vez mais devido à sua completa caracterização. Os testes empregando esse modelo animal são confiáveis e rápidos, devido ao seu curto ciclo de vida (Figura 2). Além disso, sua manutenção fácil e de baixo custo o torna uma opção mais econômica em comparação aos testes realizados em mamíferos. O *C. elegans* é também reconhecido por ser um modelo experimental que adere à política dos 3R (Redução, reutilização, refinamento) (HUBRECHT; CARTER, 2019).

O GABA, assim como em mamíferos também desempenha um papel crucial como neurotransmissor em *C. elegans*, exercendo sua ação principalmente nas junções neuromusculares (JORGENSEN, 2005). Sabe-se que dos 302 neurônios presentes nos animais hermafroditas desse organismo, 26 expressam o neurotransmissor GABA, incluindo os neurônios do tipo D – 6 DD e 13 VD, que inervam os músculos do corpo nas partes ventrais e dorsais; 4 neurônios motores RME que inervam a musculatura da cabeça; 1 interneurônio (SHEN; WEN; LIU; ZHONG *et al.*); e os neurônios motores AVL e DVB, responsáveis pela inervação da musculatura entérica do verme, conforme ilustrado

na figura 3 (JORGENSEN, 2005). Tanto em invertebrados quanto em mamíferos, a enzima responsável pela síntese de GABA é a GAD (glutamato descarboxilase). Em *C. elegans*, o gene *unc-25* é expresso especificamente nos neurônios GABAérgicos e é responsável por codificar a enzima GAD, como demonstrado anteriormente (JIN; JORGENSEN; HARTWIEG; HORVITZ, 1999).

Figura 4. Síntese de GABA e neurônios GABAérgicos em *C. elegans*



FONTE: Adaptado de (SCHUSKE; BEG; JORGENSEN, 2004)

Em mamíferos, o GABA é amplamente conhecido como o principal neurotransmissor inibitório. No entanto, em *C. elegans*, o GABA desempenha um papel dual, atuando tanto como neurotransmissor inibitório quanto excitatório. Nas contrações intestinais, os neurônios motores AVL e DVB desempenham função excitatória, provocando a contração da musculatura entérica. Por outro lado, no comportamento de locomoção, os neurônios do tipo D exercem uma função inibitória ao inibir a contração dos músculos da parede do corpo coordenados pelos neurônios dorsais e ventrais. A detecção de alterações em tais comportamentos pode levantar a hipótese de modulações específicas em neurotransmissores (JORGENSEN, 2005; SHEN; WEN; LIU; ZHONG *et al.*, 2016).

Outro sistema de neurotransmissão altamente conservado em *C. elegans* é o sistema colinérgico. Diferentemente de mamíferos, em *C. elegans* a acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor excitatório e está presente nas junções neuromusculares

desses animais. A transmissão colinérgica participa direta e indiretamente de diversos comportamentos nos vermes, como locomoção, postura de ovos e alimentação. Na locomoção, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, *C. elegans* precisa desenvolver um movimento sinusoidal. Esse movimento é coordenado por contrações musculares parcialmente inervadas pelos neurotransmissores ACh e GABA. Enquanto GABA exerce neurotransmissão inibitória de um lado do corpo do animal, ACh é responsável pela neurotransmissão excitatória do lado oposto, permitindo que o animal exerça ondas sinusoidais. Já a postura de ovos pelos vermes envolve ação de diversos neurotransmissores, sendo que ACh modula esse comportamento através de múltiplos mecanismos, apresentando como o principal efeito a diminuição do número de ovos postos (RAND, 2007). Assim como em mamíferos, a enzima responsável pela degradação de ACh em *C. elegans* é a enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo que alterações na atividade desta enzima podem estar intrinsicamente relacionadas a diversas implicações fisiológicas e comportamentais nos vermes. Tais alterações podem influenciar significativamente o funcionamento do sistema nervoso do organismo, afetando assim comportamentos e processos fisiológicos dependentes da ACh, como a locomoção e outras funções neuromusculares (RAND, 2007) (THAPLIYAL; BABU, 2018).

Além da utilização de organismos modelos alternativos a mamíferos, as metodologias *in silico* também têm sido amplamente empregadas em estudos toxicológicos por complementarem os achados experimentais. Uma dessas abordagens é o “*docking*” molecular, uma ferramenta de análise computacional que desempenha papel significativo na predição e orientação tridimensional de um ligante específico ao interagir com um receptor ou enzima. A principal abordagem do “*docking*” molecular envolve a previsão da conformação e orientação mais provável de um ligante em relação ao sítio ativo de uma macromolécula, geralmente uma proteína. A partir de um banco de dados que engloba informações detalhadas sobre estruturas proteicas, conformações ativas, e sítios de ligação relevantes, esta técnica prevê a relação atividade-estrutura (REA), possibilitando a inferência da atividade biológica de um composto com base na sua estrutura química. Isso possibilita uma gama diversificada de escolhas que podem ser estrategicamente utilizadas para otimizar e aprimorar a compreensão das interações moleculares em estudo (LI; WEI; NIU; MA *et al.*, 2022). Essa técnica é fundamental na pesquisa farmacêutica, fornecendo informações cruciais sobre possíveis interações moleculares e eficácia de novos compostos candidatos a fármacos (PINZI; RASTELLI,

2019).

Sabendo da necessidade de moléculas que sejam capazes de eficazmente proteger contra as múltiplas patologias presentes no mundo atual, e conhecendo parte dos efeitos protetivos do JM-20 em patologias envolvendo hiperestimulação do Ca^{2+} , estresse oxidativo, danos celulares e doenças neurodegenerativas, esse estudo visa contribuir para o melhor entendimento da molécula JM-20 utilizando um organismo modelo alternativo a mamíferos para elucidar diferentes vias e mecanismos de ação dessa promissora molécula candidata a fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos fármaco-toxicológicos do tratamento com JM-20 no nematódeo *C. elegans*, bem como sua ação na sinalização GABAérgica e colinérgica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir concentrações atóxicas para utilizar no tratamento do JM-20 em *C. elegans* através do acompanhamento do desenvolvimento corpóreo desses animais durante seu crescimento até a fase adulta;

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com diferentes concentrações de JM-20 na sobrevivência e em parâmetros comportamentais dos animais tanto da cepa selvagem quanto da cepa mutante CB156 (*unc-25*);

- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com JM-20 na atividade da enzima acetilcolinesterase.

- Avaliar, por meio de análise computacional, os sítios de interação de JM-20 com receptores GABAérgicos em *C. elegans*.

3. JUSTIFICATIVA

A identificação de moléculas com potencial de atuação em múltiplos alvos é de suma importância para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para diversas doenças. Com o avanço das pesquisas sobre moléculas promissoras para esse propósito, torna-se essencial a análise detalhada do perfil de toxicidade e dos mecanismos de ação envolvidos. O composto JM-20 tem despertado considerável interesse devido às suas propriedades benéficas documentadas, posicionando-o como um promissor candidato para o tratamento de patologias relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). Esta molécula contém uma porção benzodiazepínica que é prevista para conferir um possível efeito neuroprotetor, provavelmente por meio da inibição mediada pelo GABA, que contrabalança a resposta excitatória do glutamato, e uma porção diidropiridina, possivelmente responsável pela inibição da entrada de Ca^{2+} mediada pelo glutamato nas células nervosas. No entanto, como em todo estudo inicial de novos compostos, é crucial entender o perfil de toxicidade e elucidar as vias de sinalização envolvidas nos efeitos produzidos. Este estudo visa esclarecer se o JM-20 apresenta atividade tóxica após exposição crônica e, adicionalmente, elucidar os mecanismos pelos quais o JM-20 induz alterações comportamentais em *C. elegans*.

4. ARTIGO PUBLICADO

Os materiais e métodos, resultados e discussão desse trabalho serão apresentados em forma de artigo científico, o qual foi publicado na revista “Neurotoxicology” no ano de 2022 e encontra-se anexado a seguir e intitulado “JM-20 affects GABA neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*”.



JM-20 affects GABA neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*

Aline Franzen da Silva^a, Larissa Marafiga Cordeiro^a, Marcell Vallandro Soares^a, Danielle Coradini Zamberlan^a, Fabiane Bicca Obetina Baptista^a, Tássia Limana da Silveira^a, Marina Lopes Machado^a, Leticia Priscilla Arantes^b, Yanier Nuñez-Figueredo^c, Estael Ochoa Rodríguez^d, Félix Alexandre Antunes Soares^{a,*}

^a Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Camobi, Zip code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Zip code 85870-650, Foz do Iguaçu, PR, Brazil

^c Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ave 26, No. 1605 Boyeros y Puentes Grandes, CP, 10600 Habana, La Habana, Cuba

^d Laboratorio de Síntesis Orgánica de La Facultad de Química de La Universidad de La Habana (Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, Vedado Plaza de la Revolución, CP, 10400, Ciudad de la Habana, Cuba

ARTICLE INFO

Edited by Dr. M.D. Coleman

Keywords:

Benzodiazepines
JM-20
Nematode
Behavior
Screening
Safety

ABSTRACT

Along with the discovery of new candidate molecules for pharmaceuticals, several studies have emerged showing different mechanisms of action and toxicological aspects. 3-ethoxycarbonyl-2-methyl-4-(2-nitrophenyl)-4,11-dihydro-1H-pyrido[2,3-b][1,5]benzodiazepine (JM-20) is a hybrid molecule. It is derived from 1,5-benzodiazepines and structurally differentiated by the addition of 1,4-dihydropyridine bonded to the benzodiazepine ring. This gives this molecule potential neuroprotective, antioxidant, and anxiolytic activity. As this is a promising multi-target molecule, further studies are necessary to improve the knowledge about its mechanism of action. In our study, we used *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) to investigate the effects of chronic treatment with JM-20. Nematodes from the wild-type strain (N2) were treated chronically at different concentrations of JM-20. Our results show that JM-20 does not cause mortality, but higher concentrations can delay the development of worms after 48 h exposure. We assessed basic behaviors in the worm, and our data demonstrate decreased defecation cycle. Our results suggest that JM-20 acts on the *C. elegans* GABAergic system because GABA neurotransmission is associated with the worm intestine. We also observed increased locomotor activity and decreased egg-laying after JM-20 treatment. When both behaviors were evaluated in mutants with have reduced levels of GABA (*unc-25*), this effect is no observed, suggesting the GABAergic modulation. Still, the JM-20 exert similar effect of Diazepam in basic behaviors observed. To reinforce neuromodulatory action, computational analysis was performed, and results showed a JM-20 binding on allosteric sites of nematodes GABA receptors. Overall, this work provided a better understanding of the effects of JM-20 in *C. elegans* as well as showed the effects of this new molecule on the GABAergic system in this animal model.

1. Introduction

Disorders affecting the central nervous system (CNS) have a series of interconnected events involving multiple etiological mechanisms (Figueredo et al., 2013). According to Geldenhuys et al., 2011 (Geldenhuys et al., 2011), currently, no therapy capable of modulating just a single pharmacological aspect and with the capacity to prevent or completely reduce neurodegenerative processes has been developed and offered to the market. Thus, the objective of recent searches is to determine whether a single drug that can act through multiple mechanisms of

action will be able to prevent CNS disorders.

The 3-ethoxycarbonyl-2-methyl-4-(2-nitrophenyl)-4,11-dihydro-1H-pyrido[2,3-b][1,5]benzodiazepine (JM-20) (Fig. 1), a hybrid molecule and a member of a new family of 1,5 benzodiazepines, was recently developed synthetically. JM-20 has a fraction of 1,4 dihydropyridine inserted in its benzodiazepine ring, allowing simultaneous activity on calcium and GABA_A receptors (Figueredo et al., 2013). The molecule acts as a calcium channel blocker and as a GABA_A receptor agonist, which gives it anxiolytic and antioxidant properties (Nunez-Figueredo et al., 2014). Positive results were shown in traumatic brain injury (TBI),

* Correspondence to: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: felix@ufsm.br (F.A.A. Soares).

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.08.012>

Received 5 October 2021; Received in revised form 19 August 2022; Accepted 20 August 2022

Available online 24 August 2022

0161-813X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

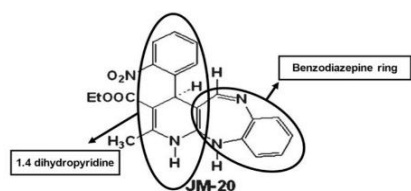


Fig. 1. Structural formula of 3-ethoxycarbonyl-2-methyl-4-(2-nitrophenyl)-4,11-dihydro-1 H-pyrido[2,3-b] benzodiazepine (JM-20).

ischemia, and Alzheimer's and Parkinson's disease models (Fonseca-Fonseca et al., 2021; Furtado et al., 2021; Nunez-Figueroa et al., 2018; Wong-Guerra et al., 2019). However, studies to elucidate its toxicological profile are still lacking.

Caenorhabditis elegans is a small free-living nematode found in the soil of temperate climate environments, feeding on bacteria and fungi (Hunt, 2017). Its genome and metabolic and biosynthetic pathways are highly conserved in mammals with a similarity of approximately 60–80% (Harris et al., 2004). This nematode has been used worldwide by researchers in the fields of toxicology and pharmacology since the possibilities for screening and toxicological evaluations of new molecules are vast in this model (O'Reilly et al., 2014).

C. elegans possesses a small and well-characterized nervous system. It presents basic behaviors, like pharyngeal pumping, a defecation cycle length, and locomotion. These behaviors are coordinated by different neurotransmission systems including glutamatergic (Brockie and Maricq, 2006), cholinergic (Rand, 2007), dopaminergic, serotonergic (Chase and Koelle, 2007) and GABAergic (Jorgensen and WormBook, 2005).

The γ -aminobutyric acid (GABA) is an important neurotransmitter in *C. elegans*, acting primarily at neuromuscular synapses. 26 of 302 neurons express the neurotransmitter GABA along the body of *C. elegans*. The 26 GABA neurons include D-type neurons – 6DD and 13VD – which innervate the dorsal and ventral body muscles; 4 RME motor neurons innervate head muscles; 1 interneuron (RIS); and AVL and DVB motor neurons, that are responsible to innervate the enteric muscles (Jorgensen and WormBook, 2005). In both mammals and invertebrates, the enzyme responsible for the synthesis of GABA is glutamic acid decarboxylase – GAD. In *C. elegans*, the gene *unc-25* is expressed specifically in GABAergic neurons and is responsible for encoding the GABA biosynthetic enzyme (Jin et al., 1999).

In *C. elegans*, GABA performs both functions: excitatory and inhibitory. In defecations of worms, the motor neurons AVL and DVB are responsible for the excitatory function, by contracting the enteric muscles. On the other hand, in locomotion, the D-type neurons inhibit the contraction of body wall muscles by dorsal and ventral neurons (Jorgensen and WormBook, 2005), (Shen et al., 2016). Changes in any of these behaviors indicate modulation of specific neurotransmitters.

Thus, the present study aims to perform a toxicological analysis of JM-20 through the observation of different behaviors, as well as clarify the GABAergic signaling performed by this compound using *C. elegans* as a model.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

JM-20 was previously synthesized and obtained by the Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ciudad Habana, Cuba (Figueroa et al., 2013). Dimethylsulfoxide (DMSO), 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) - (DTNB), acetylthiocholine iodide (ASChI), 5-thio-c 2-nitro-benzoic acid (II), Diazepam (DZP) and Bicuculine (BIC) were obtained from Sigma-Aldrich.

2.2. *Caenorhabditis elegans* strain, maintenance and treatment

The *C. elegans* strains used in this study were Bristol N2 (wild-type) and CB156 strain (*unc-25(e156)*) obtained from *Caenorhabditis elegans* Genetic Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN). The worms were kept in Petri dishes containing nematode growth medium (NGM) seeded with *E. coli* OP50 bacteria as a food source. They were manipulated in an environment with temperature control of 20 ± 2 °C.

JM-20 was diluted in DMSO in the range of 0–100 μ M and added to the surface of plates containing NGM (final volume of 3 mL) and *Escherichia coli* OP50 that were previously grown for 24 h at 37 ± 2 °C. The final concentration of DMSO on the surface of the plates was 0.3%, which does not interfere with the analyzed parameters (Hart and Behavior, 2006). Worms synchronized at the L1 stage were transferred to the plates and maintained at a temperature of 20 °C until they reached young adult stage (approximately 48 h). For the control group, DMSO was added as the vehicle in the same volume and concentration used in treatment plates.

For treatment with diazepam and bicuculine, both compounds were diluted in EtOH (0.3% final plate concentration) and added to plates containing NGM and *Escherichia coli* OP50. Then, the synchronized L1 worms were transferred to these plates and kept under same conditions as the treatment with JM-20 for 48 h.

2.3. Survival assay

About 100 worms at L1 larval stage were exposed to JM-20 at concentrations of 0, 25, 50, and 100 μ M for 48 h. Afterward, they were evaluated as alive or dead under a stereomicroscope. Using a platinum wire, the worms were gently touched, and the ones that reacted were scored as alive, and worms that did not respond were scored as dead (Bischof et al., 2006). Three independent experiments were carried out with 100 worms per group per experiment.

2.4. Development of worms

The larval stage of the nematodes was evaluated after 48 h of treatment using an optical microscope by assessing the development of the vulva, and the results were presented as the percentage of worms in each larval stage. Three independent experiments were carried out with about 100 worms per group (Arantes et al., 2016).

2.5. Behavior assay

All behavioral tests were performed in blind trials, to ensure the experimental integrity of the work.

2.5.1. Pharyngeal pumping

Using a microscope, the number of pharyngeal contractions of each worm on the treatment plate was counted for 10 s; the tests were run in triplicate. Subsequently, the values for each worm were averaged and expressed as the pharyngeal pumping/minute (Raizen et al., 2012). Ten worms per group per experiment were evaluated in three independent experiments.

2.5.2. Defecation cycle

The defecation cycle length was assessed by observing the time interval between intestinal contractions at the treatment plates. The average of three intervals in each worm was measured. There was a total of 10 worms per group per experiment in three independent trials (Bruns and Lo, 2020).

2.5.3. Locomotor activity

2.5.3.1. Head thrashes. Previously treated worms in the young adult

stage were chosen at random and placed for 1 min in a drop of M9 buffer. Then, the number of head movements of each worm was counted for 20 s. Three independent experiments were carried out, with a total of 10 worms per group per experiment (Wu et al., 2013).

2.5.3.2. Speed. Worms in their young adult stage previously treated with JM-20 were transferred to plates containing NGM without treatment and food source. Videos of these worms were recorded in a short period (approximately 1 min), and subsequently, an analysis was carried out in the automated software WormLab, which evaluated the speed-traveled parameter. Ten worms per group per experiment were evaluated.

2.5.4. Egg laying and viability assay

The average number of eggs released by each worm during four days was measured. For this, the worms pretreated with JM-20 were transferred in their young adult stage to plates containing NGM and *E. coli* OP50 and then transferred to new plates every day during the fertile period. The viability was performed by analyzing the number of eggs that indeed hatched (Zamberlan et al., 2020).

2.6. Acetylcholinesterase activity assay

The activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) was performed by the colorimetric method. After 48 h treatment, about 5000 worms were transferred to 1.5 mL microtubes together with M9 buffer. The samples were frozen and thawed three times. The homogenized sample was placed on ELISA plates containing 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 0.25 mM, and 156 mM acetylthiocholine iodide (ASChI) at a final volume of 200 μ L. Spectrophotometry was performed by kinetic reading. The results of the readings were converted to total cholinesterase activity using the extinction coefficient for the colored product, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (Zamberlan et al., 2020). This assay was performed three times.

2.7. Computational analysis

To elucidated a possible action of JM-20 in GABAergic signaling, we performed a computational analysis to test the affinity of this molecule with the GABA receptors of worms (UNC-49 and EXP-1). Molecular docking experiments were performed with Autodock vina software, and to guide the simulations, we used the cryo-EM structure of human GABAA receptor plus diazepam (PDB number: 6HUP), and the binding site was defined based on diazepam coordinates, as described by (Masiulis et al., 2019) and (Iorio et al., 2020). Receptor-interaction with the ligand diazepam and JM-20 were tested proteins homology-modeling G5EE10 (UNC-49) and G5ECJ0 (EXP-1) of *C. elegans*, acquired from Swiss Model data bank. At least 15 scoring poses were analyzed from each one of 24 runs (total of 360 clusters), and we selected the best score pose to anchor in the pocket site. Images of docking analysis were generated using the software BIOVIA Discovery Studio Visualizer v 21.1.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism® (version 7.0, San Diego, CA). Significance was assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of JM-20 on the survival rate of *C. elegans*

As shown in Fig. 2, JM-20 did not induce significant mortality in

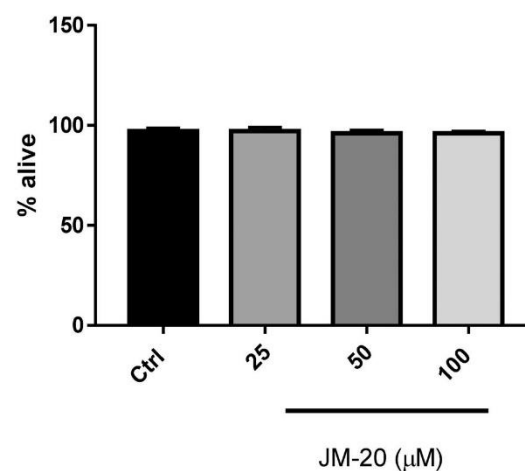


Fig. 2. Effect of JM-20 on survival. The survival rate of young adult worms of N2 strain exposed to JM-20 at different concentrations for 48 h. Data were derived from three independent assays with 100 worms per group in each experiment. Results are represented as means \pm SEM. Groups are compared to the control after analysis by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test.

treated worms at the concentrations of 25, 50, and 100 μ M when compared to the control group.

3.2. Effects of JM-20 on larval development in *C. elegans*

It was observed that JM-20 exerted an effect on worms' development. Most of worms did not reach the L4 stage after 48 h when treated with JM-20 at high concentrations (Fig. 3-A). However, in concentrations of 1, 5, and 10 μ M of JM-20, no significant differences were observed in the development of the worms when compared to the control group (Fig. 3-B). Thus, these lower concentrations were chosen for the next experiments.

3.3. Effects of JM-20 on basic behavior parameters in *C. elegans*

As shown in Fig. 4-A, no differences were observed among the groups in pharyngeal pumping behavior after treatment with JM-20. The duration of the defecation cycle was significantly reduced at 5 and 10 μ M when compared to the control group (10.29% and 10.98%, respectively) ($p < 0.001$ Fig. 4-B). The control group duration was 49 ± 5.5 s, while in the group containing 5 and 10 μ M of JM-20, it was 44 ± 5.8 and 43 ± 6.2 s, respectively. In mutant worms, JM-20 showed a different effect. The defecation cycle in CB156 has no significant difference between treated and control worms.

3.4. Effects of JM-20 on *C. elegans* locomotion

As shown in Fig. 5, JM-20 in the concentrations of 5 and 10 μ M increased the number of the worm's head thrashes when compared to the control group (9.79% and 13.3% respectively) ($p < 0.001$; Fig. 5-A). In the control group, the number of thrashes was 105 ± 7.8 , while in groups with 5 and 10 μ M of JM-20, it was 116 ± 3.8 and 119 ± 6.01 thrashes per minute, respectively. Furthermore, a significant increase was observed in the speed in the worms treated with 10 μ M JM-20 ($p < 0.05$; Fig. 5-B).

3.5. Effects of JM-20 on egg-laying and viability

Worms treated with 1, 5, and 10 μ M JM-20 presented a reduced

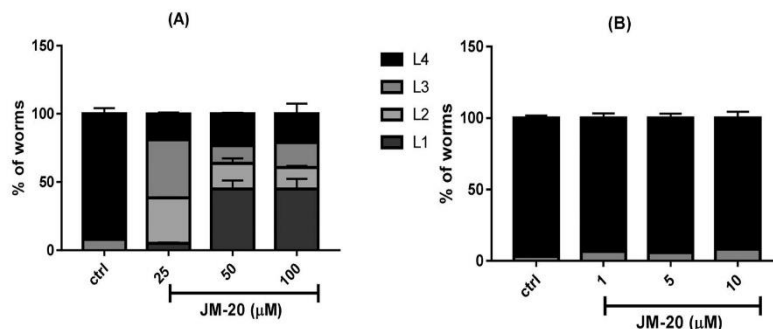


Fig. 3. Effect of JM-20 on larval development. Larval development of N2 strains after 48 h exposure to JM-20 at different concentrations: (A) 25, 50, and 100 μM and (B) 1, 5, and 10 μM. Worms were analyzed using a stereomicroscope by observing the size and development of the vulva. Data were derived from three independent assays with 100 worms per group in each experiment. Results are represented as means \pm SEM. Groups are compared to the control after analysis by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test.

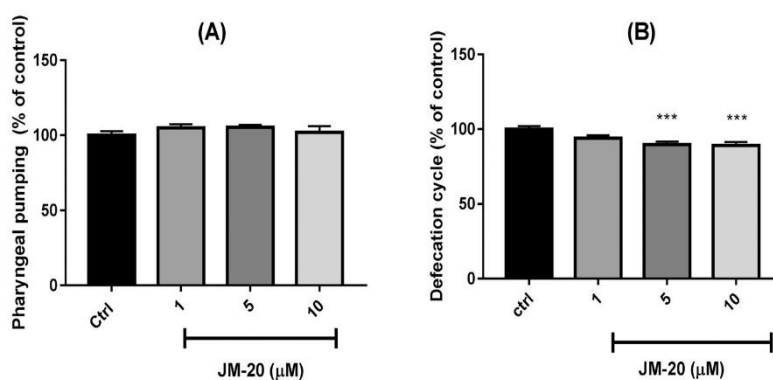


Fig. 4. Effect of JM-20 on basic behavior parameters. (A) The number of pharyngeal pumping actions in young adult worms of N2 strain exposed to JM-20 for 48 h (B) Defecation cycle of young adult worms of N2 strain after 48 h of exposure to JM-20 at the different concentrations. Data are expressed as the percentage of control for each behavior and derived from three independent assays with 10 worms per group in each experiment. Results are represented as means \pm SEM, *** p < 0.001, compared to the control after analysis by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test.

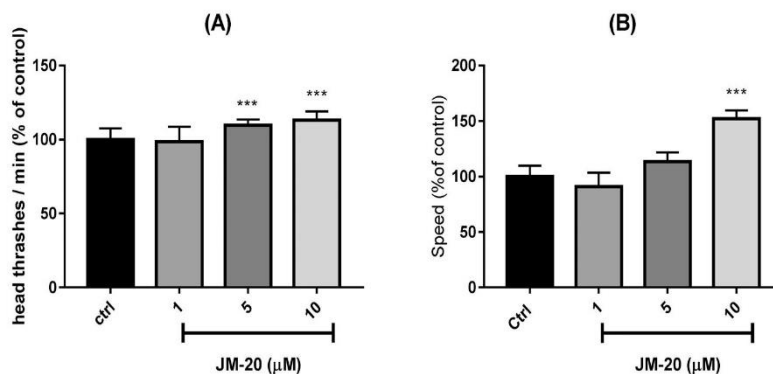


Fig. 5. Effect of JM-20 on locomotion. (A) Head thrashes per minute in young adult worms of N2 strain after 48 h exposure to JM-20. (B) Speed traveled by young adult worms of N2 strain exposed to JM-20 for 48 h. The analysis was performed using WormLab software. Both data sets were derived from three independent assays with 10 worms per group in each experiment. Results are expressed as the percentage of control and represented as means \pm SEM, *** p < 0.001, compared to control (One-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test).

number of total eggs laid by the worms when compared to the control group (p < 0.05; Fig. 6-A). The mean number of eggs laid in control group worms was 190 ± 28.4 , while in the worms treated with 1, 5, and 10 μM of JM-20, it was 157 ± 25.5 , 165 ± 26.06 and 162 ± 24.9 eggs, respectively, a reduction of 17.2%, 12.8%, and 14.3%. The viability of eggs has no significant difference from control group (Fig. 6-B).

3.6. Effect of JM-20 in *unc-25* mutant worms

Head thrashes and defecation cycle was carried out in *unc-25* worms. When head thrashes behavior was performed in *unc-25* mutant worms, there was no significant difference between treated and control worms, but only in comparison to the wild-type strain (Fig. 7-A). The defecation cycle has no significant difference between treated and control worms (Fig. 7-B).

3.7. Effect of agonist and antagonist drugs in *C. elegans*

Worms treated with 100 μM diazepam (DZP) showed a significant difference in comparison to control group for thrashes and defecation cycle behaviors. In thrashes behavior, worms increased around 9% when compared to control group (p < 0.1; Fig. 1-A). In Fig. 1-B DZP shows a decrease in defecation cycle around 11% (p < 0.1). Bicuculine has no significant difference from the control group in neither of behaviors.

3.7. Effect of JM-20 on acetylcholinesterase activity in *C. elegans*

When compared to the control group, JM-20 showed no significant effect on the activity of the enzyme acetylcholinesterase at the three concentrations used (Fig.S2).

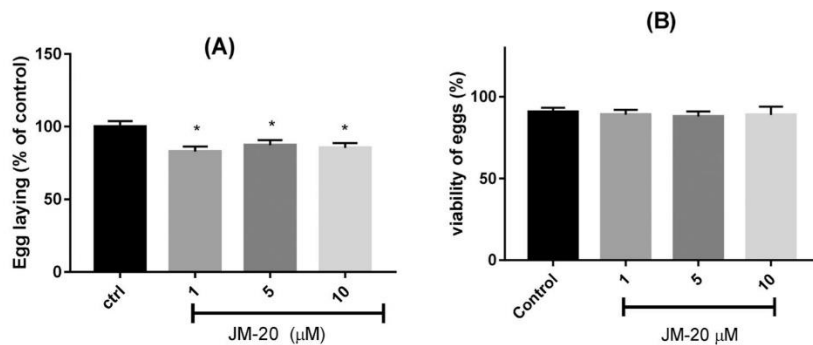


Fig. 6. Effect of JM-20 on brood size. (A) Percentage of eggs laid by worms of N2 strain after 48 h of treatment with JM-20. (B) percentage of viability of eggs laid by worms of N2 strain after 48 h of treatment with JM-20. Data were derived from three independent assays with 5 worms per group in each experiment. Results are expressed as a percentage of viability and as percentage of control of the number of eggs laid by worms and represented as means \pm SEM, * $p < 0.005$, compared to control (One-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test).

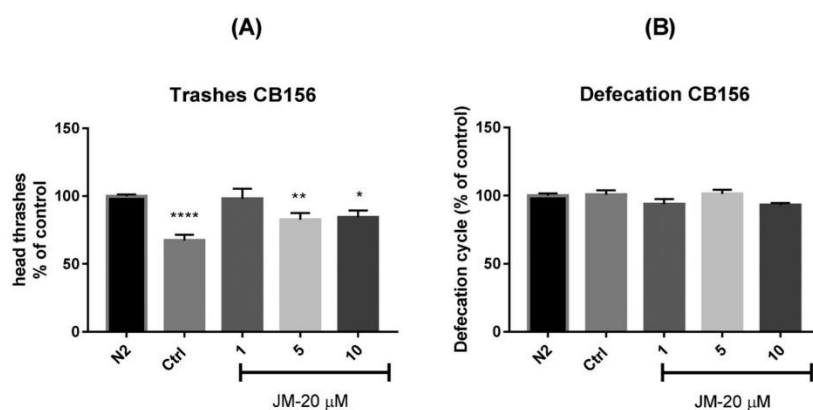


Fig. 7. Effect of JM-20 on mutants for GABA. (A) Head thrashes per minute in young adult worms of unc-25 strain (CB156) after 48 h of exposure to JM-20. (B) Defecation cycle of young adult worms of unc-25 strain (CB156) strain after 48 h of exposure to JM-20 at the different concentrations. Data are expressed as the percentage of control for each behavior and derived from three independent assays with 10 worms per group in each experiment. Results are represented as means \pm SEM, **** $p < 0.001$, compared to the N2 group after analysis by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test.

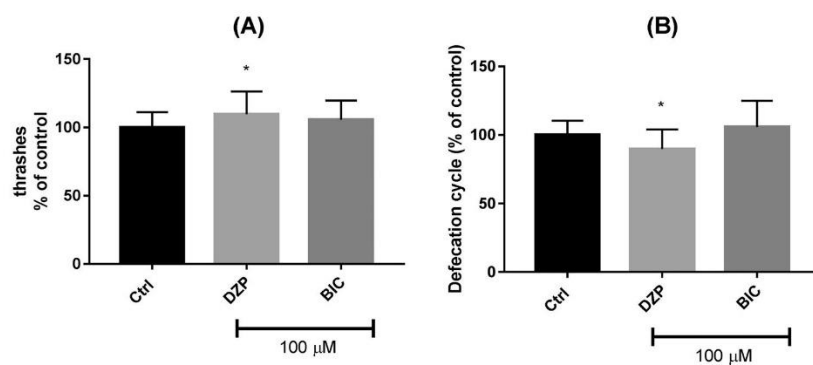


Fig. 8. Effect of agonist and antagonist drugs in basic behaviors in *C. elegans*. (A) Head thrashes per minute and (B) Defecation cycle of young adult worms of N2 strain after 48 h of exposure to Diazepam or Bicuculline. Data are expressed as the percentage of control for each behavior and derived from three independent assays with 10 worms per group in each experiment. Results are represented as means \pm SEM, * $p < 0.1$, compared to the control group after analysis by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test.

3.8. JM-20 binds on nematodes GABA receptors

A comparison between human GABA_A and *C. elegans* UNC-49 on binding sites for diazepam shows that the ligand interacts differently, but in the same pocket site on receptor (Fig. S1A and B). When analyzing the interaction of JM-20/diazepam in UNC-49 receptor, we observed that JM-20 binding near to the reference pocket site of diazepam in 6HUP model (Fig. 9 A) and in the same region of diazepam in G5EE10 model (Fig. 9B and C). Following this, we verify the interaction of JM-20 in EXP-1 receptor and observed a different binding site in comparison to diazepam coordinates (Fig. 9D).

4. Discussion

Neurological disorders are commonly associated with multiple molecular mechanisms, and thus multi-target molecules might be a valid strategy to combat CNS diseases. In this study, we evaluated the effects induced by JM-20, a new molecule created to act on more than one molecular target, using the nematode *C. elegans* as an experimental model. Our data showed that JM-20 did not affect the worm's survival at 25, 50, and 100 μM (Fig. 2), but it delayed the larval development at the same concentrations (Fig. 3 A). These results suggest that JM-20 acts in some way by altering the cell cycle of the worm, and it may modulate

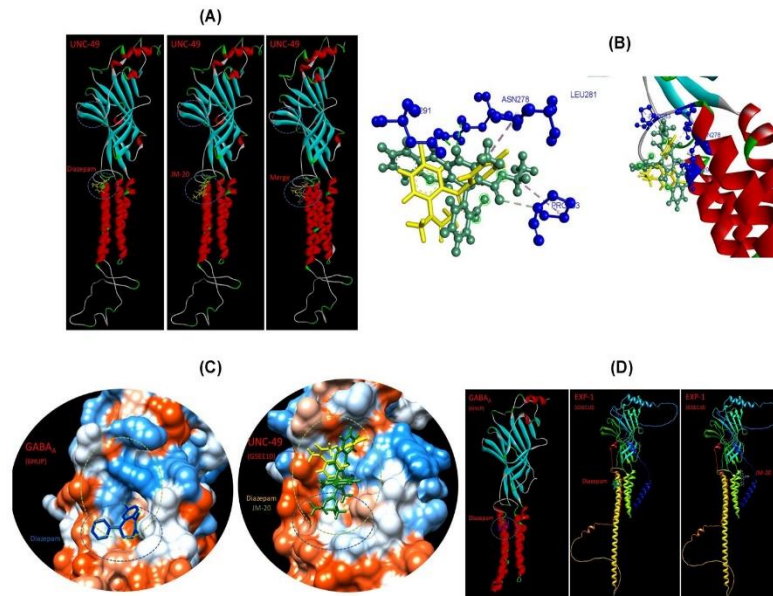


Fig. 9. JM-20 interacts with UNC-49 and EXP-1 receptors. The computational analysis demonstrated that JM-20 (green color) binds to the same “pocket” site of diazepam (yellow color) on UNC-49 receptor, represented by blue circles of dashed lines in letter A and in B a merged of diazepam and JM-20, and in a similar region of diazepam (blue color) on the pocket site (blue circle) of GABA_A model (C, PDB: 6HUP). In addition, we show that JM-20 interacts in a different area from diazepam on the EXP-1 receptor (D).

some signaling pathways necessary for normal development without causing mortality. The findings of Donohoe, 2006 (Donohoe et al., 2006) showed an adverse effect of antipsychotic drugs on *C. elegans* development and demonstrated that this worm may be an appropriate model system for investigating potential adverse effects of antipsychotic drugs on growth and development. The mechanism by which JM-20 causes the development delay is still under investigation.

The laying of eggs together with viability measures the brood size of each worm. It is a toxicological evaluation parameter with greater sensitivity than the lethal dose evaluation itself because the inhibitory effects on the worm's egg-laying occur at much lower concentrations than the lethal concentrations (Bischof et al., 2006). This test shows the ability of a compound to inhibit the production of the next generation of worms. In this study, JM-20 was able to decrease the total amount of eggs laid by the worms at all concentrations used (Fig. 6). In unfavorable environments or on exposure to molecules with potential toxicity, organisms tend to reduce their egg production (Mukhopadhyay and Tisenbaum, 2007). Although, with the egg viability result it is possible to reinforce that the decrease in egg laying is not due to the toxicity of the compound, but to the possible GABAergic signaling mediated by JM-20, once the vulval muscles are sensitive to GABA, as shown in literature (Hernando and Bouzat, 2014). We chose non-toxic concentrations of JM-20 to worm's development: 1, 5, and 10 μ M (Fig. 3-B) to perform the behavioral tests, in order to investigate the possible behavioral effects of JM-20. The worms treated with JM-20 did not present alteration on pharyngeal pumping behavior when compared to untreated worms (Fig. 4-A), although the treatment induced a significant acceleration in the defecation cycle (Fig. 4-B). The intestine is one of the largest organs in the worm (McGhee, 2007). Two main GABAergic neurons (AVL and DVB) innervate the enteric musculature of *C. elegans*. During the defecation of the worm, the GABAergic neurons stimulate the contraction of the enteric muscles, exerting an excitatory effect. Changes in intestinal contractions can be caused by increased GABA signaling and release, thus stimulating this behavior (Schuske et al., 2004). This result may suggest that the action of JM-20 in the *C. elegans* could be due to its capacity to modulate the GABAergic system. Furthermore, calcium oscillations are involved in regulating defecation length (Branicky and Hekimi, 2006).

The JM-20 molecule could exert its activity directly on the calcium channels and GABA receptor, and this may explain why these behaviors are being modulated by JM-20. To reinforce this hypothesis, we used the CB156 strain (*unc-25(e156)*). This strain does not express the GAD enzyme, reflected in lower levels of GABA at the neuromuscular junction (Jin et al., 1999). We analyzed the two main behaviors modulated by the GABAergic system. We observed that in the defecation cycle, there is no significant difference (Fig. 7-B), suggesting that the effects of JM-20 are dependent on normal levels of GABA since these effects were lost when evaluated in the mutant. Although GABA modulates the defecation cycle in worms, the reduced GABA levels in CB156 strain did not show significant differences compared with wild-type worms in this behavior (Fig. 7-B). This can be occurring because even at low concentrations, the amount of GABA seems to be sufficient to maintain function in this strain. Despite this, when we analyzed the thrashes in CB156 strain, the reduction of GABA levels resulted in changes in this behavior (Fig. 7-A) as well as in body bends behavior (Fig. S3). Furthermore, it is known that *C. elegans* have in the ventral nerve cord 19 GABAergic neurons, and only 2 GABAergic neurons (AVL and DVB) innervate the intestinal muscles (Schuske et al., 2004). This is consistent with our results where the effects on locomotive behavior show significant differences between N2 and CB156 worms, while this difference was not observed in defecation cycle. We therefore hypothesize that a decrease in GABA levels may have a more important impact on behaviors associated with locomotion, since there is greater dependence on normal levels of this neurotransmitter, but sufficient to maintain the behavioral response in defecation.

After analyzing the locomotion of nematodes exposed to JM-20, we observed a significant increase in the movement of head thrashes at 5 and 10 μ M of JM-20 (Fig. 5-A). The worm's locomotion is strongly related to GABAergic and additionally the cholinergic system (Zhen and Samuel, 2015). The increase in cholinergic signaling can lead to increased locomotion of the worm. In this study, it was seen that the treatment with JM-20 induced an increase in the worm's locomotion speed (Fig. 5-B). The worm's motor neurons release acetylcholine, which is responsible for contracting the muscles on one side of the worm's body, while on the opposite side there is the release of GABA causing the muscles to relax, which allows the worm to move in a

sinusoidal manner (Schuske et al., 2004). Thrashes behavior in mutant for GAD shows a difference between wild-type and *unc-25* mutant, but between control and treated worms, there is no difference, reinforcing the participation of JM-20 in GABAergic signaling. We then aimed to investigate whether, beyond GABA signaling, JM-20 could also be acting on cholinergic signaling.

Acetylcholine is an important neurotransmitter and it is responsible for transmitting nerve impulses between neurons during synapses (Li et al., 2020). In *C. elegans*, acetylcholine is the major excitatory neurotransmitter at the neuromuscular junction (NMJ) (Thapliyal and Babu, 2018). In nematodes, as in mammals, the control of cholinergic transmission occurs via the enzyme acetylcholinesterase (AChE), with the main function of degrading acetylcholine at the NMJ. D'Avila da Silva et al. work showed that JM-20 was able to inhibit AChE at low concentrations in vitro (Garrido-Suarez et al., 2020). We then sought to assess whether the compound JM-20 also shows activity in vivo via AChE inhibition, which would explain the observed locomotor behaviors (Fig. 5). However, in the concentrations used here, our results do not demonstrate the action of JM-20 on AChE activity, supporting the hypothesis that the action of this molecule is mainly on the GABAergic system in *C. elegans* (Fig. S2).

To corroborate with our findings, we performed head thrashes and defecation cycle using a known GABAergic agonist and an antagonist – Diazepam and Bicuculine. We compared the effects of both compounds and we observed that at 100 μ M of DZP the observed effects were similar to those of JM-20. This result indicates that although the molecules are different, the moiety dihydropyridine does not interfere in GABAergic agonist effect, once the effect persists. This was also observed by Garrido-Suarez et al., when DZP showed similar effect to JM-20 in different parameters (Garrido-Suarez et al., 2020). Bicuculine is an antagonist of the GABA-A receptor (Schneider and Rodriguez, 2006), but there is no significant difference between BIC and control worms in either behavior. Our results are consistent with those of Bamber et al., once that bicuculline had no effect on UNC-49 (Bamber et al., 2003).

It is known that numerous GABAergic agonists act via GABA-dependent allosteric binding sites, such as benzodiazepines and barbiturates (Kim et al., 2020). Believing that possibly JM-20 can act similarly, we performed a computational analysis of the action of JM-20 on GABA receptors of *C. elegans*.

In the nematodes, there are two GABA_A receptor types, UNC 49 (inhibitory effects) and EXP-1 (excitatory effects), that control, respectively, locomotor movements and defecation cycle (Bamber et al., 2005) (Lee et al., 2005). Besides this, receptors-response to many molecules/drugs was characterized in literature (Bamber et al., 2003; Beg and Jorgensen, 2003). To verify a possible GABAergic neuromodulator effect mediated by JM-20, we performed a computational analysis, testing the bind of molecule in nematodes GABA receptor. Based on our previous results (Figs. 6 and 7), probably, JM-20 act as an agonist molecule, since, the compound effects are dependent of GABA levels.

Then, in the *in silico* approaches, we used specifically targets by allosteric modulators: the transmembrane pore region. As a positive control (known ligand), we used the diazepam molecule to guide the correct binding site (Masiulis et al., 2019). As shown in Fig. 9-A and B, the structure overlay of molecules demonstrated that JM-20 (Green et al., 2000) and diazepam (yellow) share the same binding site on the UNC-49 receptor. Additionally, these ligands bind near to region of human GABA_A receptor, indicating a conserved pocket site (Fig. 9 C).

However, simulations on the EXP-1 receptor, appoint a distinct binding related to diazepam target, as shown in Fig. 9D, although we observed this divergent location, we need to consider that ligands can interact with many regions on the transmembrane domain (Iorio et al., 2020). Furthermore, when we analyzed *unc-25* mutants (Fig. 7B), the JM-20 effect in defecation cycle (faster defecation) was lost, suggesting the dependence of GABA for excitatory modulation, by the way, the viability assay (Fig. 6B) also corroborates the neuromodulatory hypothesis, since, the reduced egg-laying is not due a toxic effect (hatched

percentage equal control), and possibly is by a signaling imbalance.

The molecular structure of JM-20 indicates that it exerts an effect precisely on GABA receptors and calcium channels, due to the benzodiazepine and dihydropyridine fractions, respectively. Overall, the results of this work corroborate the search for the safety of the JM-20 molecule and reinforce the need for toxicological screening in sensitive organisms, such as *C. elegans*.

5. Conclusion

This work presents the first toxicity assessment of JM-20, a new molecule that has emerged as a promising molecule for the treatment of several diseases, using the alternative model, *C. elegans*. Our results demonstrate changes in basic behaviors after treatment with JM-20 in wild-type strain, but in GABA mutants, the effect disappears, suggesting the need for normal levels of GABA to JM-20 to exert the effect. The normal viability of eggs shows that the decrease in egg laying is not due to the toxicity of the compound, but to the GABAergic signaling mediated by JM-20, once the vulval muscles are sensitive to GABA. The GABAergic system and calcium signaling are involved with defecation behavior, which was shown to have increased in our results and seems dependent on normal levels of GABA. This suggests the action of JM-20 on this neurotransmission system and agrees with the purpose of the molecule; the dihydropyridine fraction is responsible for acting on calcium channels, and the benzodiazepine fraction is responsible for acting on GABA receptors, as shown in computational analysis on UNC-49/EXP-1 receptors.

As it is a promising molecule for the treatment of several neurological disorders, a preliminary assessment of any possible adverse effect is essential. Additional studies are needed to clarify the actions of this molecule in vivo, including in models for neurodegenerative diseases like Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases, and to unravel the pathways and molecular mechanisms of JM-20.

CRedit authorship contribution statement

Aline Franzen da Silva: Conceptualization, Methodology, Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Term. Larissa Marafija Cordeiro:** Conceptualization, Visualization. **Marcell Vallandro Soares:** Conceptualization, Methodology, Data curation. **Danielle Coradini Zamberlan:** Conceptualization, Methodology. **Fabiane Obetina:** Conceptualization, Methodology. **Tássia Limana da Silveira:** Conceptualization, Methodology. **Marina Lopes Machado:** Conceptualization, Methodology, Visualization. **Leticia Arantes:** Supervision, Conceptualization. **Term. Yanier Nuñez-Figueroa:** Compound synthesis, review. **Estael Ochoa Rodríguez:** Compound synthesis, review. **Félix Alexandre Antunes Soares:** Conceptualization, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)", "Programa de Apoio a Núcleos Emergentes" (PRONEM/FAPERGS) and Universidade Federal de Santa Maria for their support of this work.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.neuro.2022.08.012.

References

- Arantes, L.P., et al., 2016. Guarana (Paullinia cupana Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol. Res.* 5 (6), 1629–1638.
- Bamber, B.A., et al., 2005. The composition of the GABA receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 144 (4), 502–509.
- Bamber, B.A., Twyman, R.E., Jorgensen, E.M., 2003. Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br. J. Pharmacol.* 138 (5), 883–893.
- Beg, A.A., Jorgensen, E.M., 2003. EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat. Neurosci.* 6 (11), 1145–1152.
- Bischof, L.J., Huffman, D.L., Aroian, R.V., 2006. Assays for toxicity studies in *C. elegans* with Bt crystal proteins. *Methods Mol. Biol.* 351, 139–54.
- Branicky, R., Hekimi, S., 2006. What keeps *C. elegans* regular: the genetics of defecation. *Trends Genet.* 22 (10), 571–579.
- Brockie, P.J., Maricq, A.V., 2006. Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology. *WormBook* 1–16.
- Bruns, A.N., Lo, S.H., 2020. Tensin regulates pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys. Res Commun.* 522 (3), 599–603.
- Chase, D.L.; Koelle, M.R. *Biogenic amine neurotransmitters in C. elegans*, 2007. *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.132.1.
- Donohoe, D.R., et al., 2006. Antipsychotic drugs disrupt normal development in *Caenorhabditis elegans* via additional mechanisms besides dopamine and serotonin receptors. *Pharmacol. Res.* 54 (5), 361–372.
- Figueredo, Y.N., et al., 2013. Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20: a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule. *Neurol. Res.* 35 (8), 804–12.
- Fonseca-Fonseca, L.A., et al., 2021. JM-20 protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in models of Parkinson's disease: Mitochondrial protection and antioxidant properties. *Neurotoxicology* 82, 89–98.
- Furtado, A.B.V., et al., 2021. JM-20 treatment after mild traumatic brain injury reduces glial cell pro-inflammatory signaling and behavioral and cognitive deficits by increasing neurotrophin expression. *Mol. Neurobiol.*
- Garrido-Suarez, B.B., et al., 2020. Anti-hypernociceptive and anti-inflammatory effects of JM-20: A novel hybrid neuroprotective compound. *Brain Res Bull.* 165, 185–197.
- Geldenhuys, W.J., et al., 2011. The emergence of designed multiple ligands for neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* 94 (4), 347–359.
- Green, A.R., Hainsworth, A.H., Jackson, D.M., 2000. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology* 39 (9), 1483–94.
- Harris, T.W., et al., 2004. WormBase: a multi-species resource for nematode biology and genomics. *Nucleic Acids Res.* 32, D411–D417 (Database Issue).
- Hernando, G., Bouzat, C., 2014. *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction: GABA receptors and ivermectin action. *PLoS One* 9 (4), e95072.
- Hunt, P.R., 2017. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* 37 (1), 50–59.
- Iorio, M.T., et al., 2020. GABAA receptor ligands often interact with binding sites in the transmembrane domain and in the extracellular domain-can the promiscuity code be cracked? *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1.
- Jin, Y., et al., 1999. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-25* encodes glutamic acid decarboxylase and is required for synaptic transmission but not synaptic development. *J. Neurosci.* 19 (2), 539–548.
- Kim, J.J., et al., 2020. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature* 585 (7824), 303–308.
- Lee, J., et al., 2005. Calcineurin regulates enteric muscle contraction through EXP-1, excitatory GABA-gated channel, in *C. elegans*. *J. Mol. Biol.* 352 (2), 313–318.
- Li, M., et al., 2020. Inhibitory activities of flavonoids from *Eupatorium adenophorum* against acetylcholinesterase. *Pest. Biochem. Physiol.* 170, 104701.
- Masiulis, S., et al., 2019. GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature* 565 (7740), 454–459.
- Jorgensen, E.M., Gaba. *WormBook*, 2005. 1–13. doi/10.1895/wormbook.1.14.1.
- Hart, Anne C., ed. *Behavior*, 2006. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.87.1.
- McGhee, J.D. *The C. elegans intestine*, 2007. *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.87.1.
- Mukhopadhyay, A., Tissenbaum, H.A., 2007. Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*. *Trends Cell Biol.* 17 (2), 65–71.
- Nunez-Figueroa, Y., et al., 2014. Antioxidant effects of JM-20 on rat brain mitochondria and synaptosomes: mitoprotection against Ca(2+)-induced mitochondrial impairment. *Brain Res. Bull.* 109, 68–76.
- Nunez-Figueroa, Y., et al., 2018. Multi-targeting effects of a new synthetic molecule (JM-20) in experimental models of cerebral ischemia. *Pharm. Rep.* 70 (4), 699–704.
- O'Reilly, L.P., et al., 2014. *C. elegans* in high throughput drug discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70, 247–253.
- Raizen, D., et al., 2012. Methods for measuring pharyngeal behaviors. *WormBook* 1–13.
- Schneider, P.G., Rodriguez de Loes Arnaiz, G., 2006. Convulsant bicuculline modifies CNS muscarinic receptor affinity. *BMC Neurosci.* 7, 32.
- Schuske, K., Beg, A.A., Jorgensen, E.M., 2004. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci.* 27 (7), 407–14.
- Shen, Y., et al., 2016. An extrasynaptic GABAergic signal modulates a pattern of forward movement in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 5.
- Thapliyal, S., Babu, K., 2018. *C. elegans* locomotion: finding balance in imbalance. *Adv. Exp. Med Biol.* 1112, 185–196.
- Wong-Guerra, M., et al., 2019. JM-20 protects memory acquisition and consolidation on scopolamine model of cognitive impairment. *Neurol. Res.* 41 (5), 385–398.
- Wu, Q., et al., 2013. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 90 (3), 1123–1131.
- Zamberlan, D.C., et al., 2020. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) protects against amyloid-beta toxicity in *Caenorhabditis elegans* through heat shock protein response activation. *Nutr. Neurosci.* 23 (6), 444–454.
- Zhen, M., Samuel, A.D., 2015. *C. elegans* locomotion: small circuits, complex functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 33, 117–126.
- Rand, J.B. *Acetylcholine*, 2007. *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.131.1.

Supplementary material for:

JM-20 affects GABA neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*

Aline Franzen da Silva ^a, Larissa Marafiga Cordeiro ^a; Marcell Vallandro Soares ^a, Danielle Coradini Zamberlan ^a, Fabiane Bicca Obetine Baptista ^a; Tássia Limana da Silveira ^a, Marina Lopes Machado ^a, Leticia Priscilla Arantes ^b, Yanier Nuñez-Figueroa ^c, Estael Ochoa Rodríguez ^d; Félix Alexandre Antunes Soares ^a *

^a Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Camobi, Zip code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Zip code 85870-650, Foz do Iguaçu, PR, Brazil.

^c Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ave 26, No. 1605 Boyeros y Puentes Grandes, CP 10600 Habana, La Habana, Cuba

^d Laboratorio de Síntesis Orgánica de La Facultad de Química de La Universidad de La Habana (Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, Vedado Plaza de la Revolución, CP 10400, Ciudad de la Habana, Cuba

*CORRESPONDING AUTHOR: Felix Alexandre Antunes Soares

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - CCNE – Universidade Federal de Santa Maria - 97105-900 - Santa Maria - RS - Brazil

Phone: +55-55-3220-9522 / E-mail: felix@ufsm.br

FIGURE SUPPLEMENTARY SUBTITLES:

Figure S1. UNC-49 and GABAA receptors comparison. Computational analysis shows that diazepam binding site in GABA receptors are conserved between nematodes and humans, the allosteric site is represented by blue dashed lines circles, and the GABA neurotransmitter bind site by red dashed lines circles(A) and alongside (B), a hydrophobic surface representation of diazepam (blue color) bound in an allosteric pocket site from 6HUP model (blue circle).

Figure S2. Effect of JM-20 on the activity of the enzyme Acetylcholinesterase (AChE). Data were derived from four independent assays. Results are represented as means \pm SEM.

Fig. S3. Body bends of N2 and CB156 strain. Data are represented as means \pm SEM, * $p < 0.001$, compared to the N2 group. Data were evaluated by t test.

Figure S1.

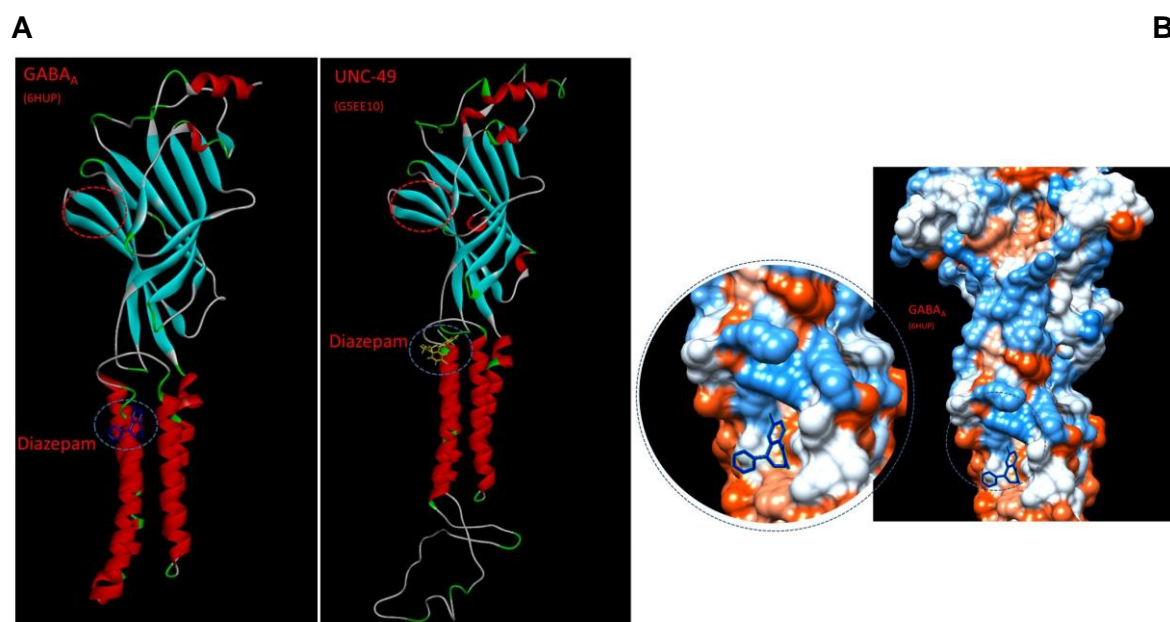


Figure S2.

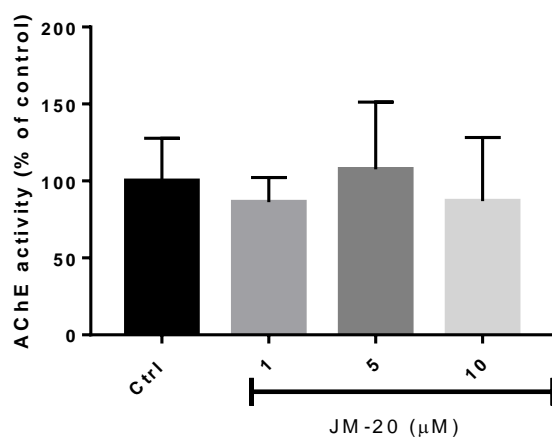
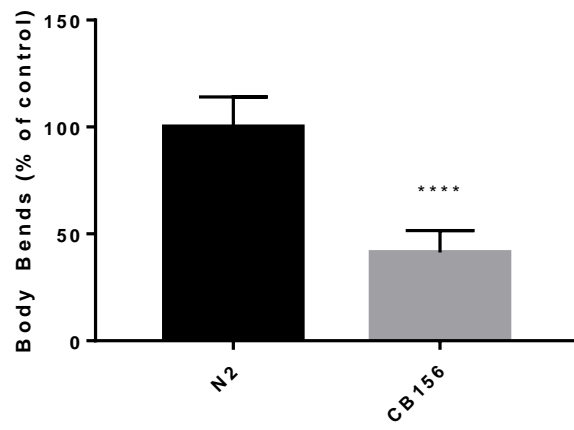


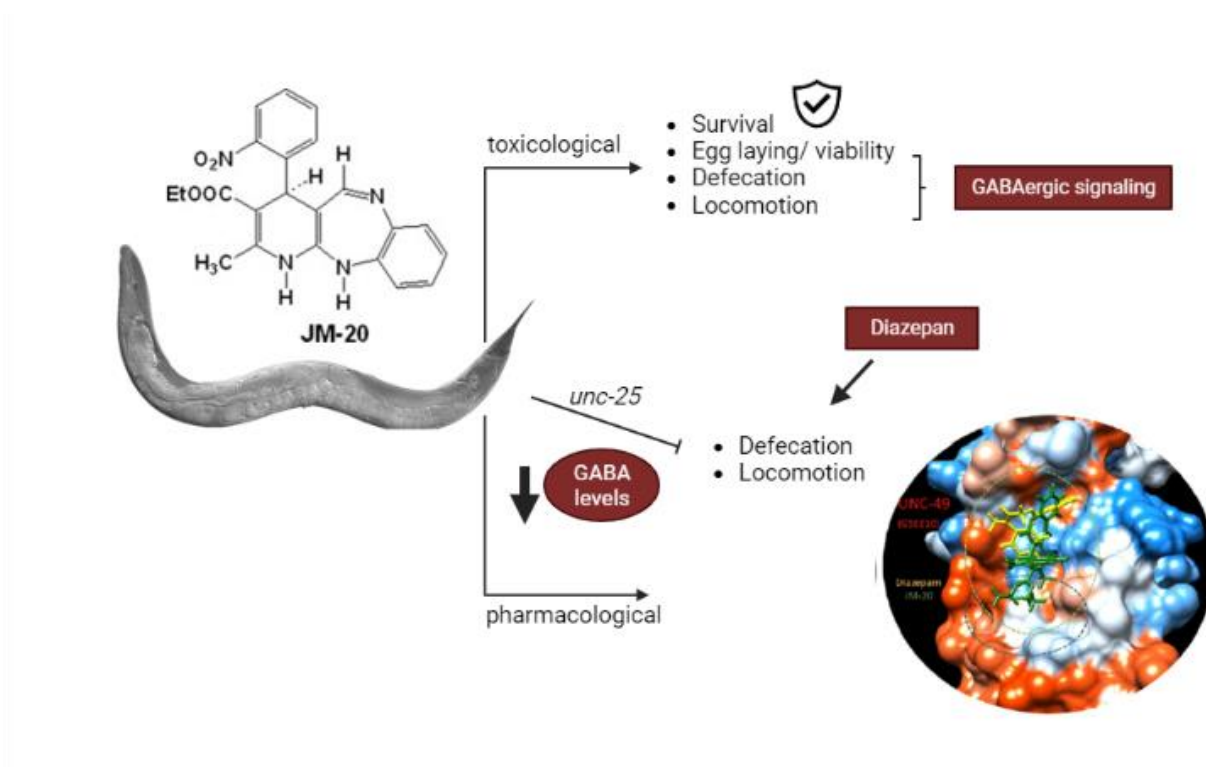
Figure S3.



5. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo explora os potenciais efeitos de JM-20, uma molécula “multi-target” projetada para lidar com a complexidade das doenças neurológicas. Usando o nematódeo *C. elegans* como organismo modelo, este estudo traz insights sobre o impacto do JM-20 em vários aspectos da fisiologia e comportamento do nematódeo. As descobertas sugerem que o JM-20 não induz mortalidade em *C. elegans*, embora atrase o desenvolvimento larval. O JM-20 reduziu o tamanho da ninhada dos vermes, o que é um indicador de toxicidade reprodutiva potencial, no entanto, essa redução parece não estar relacionada à toxicidade do composto. O estudo também destaca o possível papel do JM-20 na modulação do sistema GABAérgico, com efeitos sobre comportamentos como a defecação e a locomoção. A modulação da sinalização GABAérgica pelo JM-20 demonstra ser um fator chave dos efeitos observados nos comportamentos do nematódeo, como demonstrado pelos efeitos opostos em mutantes deficientes em GABA. Além disso, análises *in silico* sugerem que o JM-20 pode atuar como um agonista no receptor GABA_A (UNC-49), proporcionando uma compreensão em nível molecular de seu mecanismo de ação. Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo demonstram os efeitos do JM-20 em *C. elegans*, ressaltando a importância de investigações mais aprofundadas para compreender sua ação *in vivo*. Esse trabalho amplia horizontes para estudos envolvendo a ação dessa molécula em diferentes modelos experimentais.

GRAPHICAL ABSTRACT

Figura 5: ação do JM-20 no nematodeo *Caenorhabditis elegans*.

FONTE: A autora

6. PERSPECTIVAS

Uma vez que a sinalização GABAérgica, bem como o perfil toxicológico de JM-20 já foram avaliados em *C. elegans*, a perspectiva é associar o tratamento com o composto em modelos de doenças neurodegenerativas, como a DA. JM-20 se mostrou eficaz em estudos utilizando modelos de doenças neurodegenerativas, e a utilização de *C. elegans* pode, aliada com estudos em mamíferos, elucidar diferentes mecanismos de ação pelos quais o JM-20 desempenha efeito neuroprotetor.

7. BIBLIOGRAFIA

A, P.; MAKAM, P. 1,4-Dihydropyridine: synthetic advances, medicinal and insecticidal properties. **RSC Adv**, 12, n. 45, p. 29253-29290, Oct 11 2022.

AKYUZ, E.; POLAT, A. K.; EROGLU, E.; KULLU, I. *et al.* Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. **Life Sci**, 265, p. 118826, Jan 15 2021.

AMANTEA, D.; BAGETTA, G. Excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in stroke: from neurotoxicity to ischemic tolerance. **Curr Opin Pharmacol**, 35, p. 111-119, Aug 2017.

ARVANITIS, M.; LI, D. D.; LEE, K.; MYLONAKIS, E. Apoptosis in *C. elegans*: lessons for cancer and immunity. **Front Cell Infect Microbiol**, 3, p. 67, 2013.

ATKIN, T.; COMAI, S.; GOBBI, G. Drugs for Insomnia beyond Benzodiazepines: Pharmacology, Clinical Applications, and Discovery. **Pharmacol Rev**, 70, n. 2, p. 197-245, Apr 2018.

BRAVO-SAGUA, R.; PARRA, V.; LOPEZ-CRISOSTO, C.; DIAZ, P. *et al.* Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. **Compr Physiol**, 7, n. 2, p. 623-634, Mar 16 2017.

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

BROCKIE, P. J.; MARICQ, A. V. Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology. **WormBook**, p. 1-16, Jan 19 2006.

BURGOS, J. S.; BARAT, A.; RAMIREZ, G. Guanine nucleotides block agonist-driven 45Ca^{2+} influx in chick embryo retinal explants. **Neuroreport**, 11, n. 10, p. 2303-2305, Jul 14 2000.

CHASE, D. L.; KOELLE, M. R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. **WormBook**, p. 1-15, Feb 20 2007.

D'AVILA DA SILVA, F.; NOGARA, P. A.; OCHOA-RODRIGUEZ, E.; NUNEZ-FIGUEREDO, Y. *et al.* Molecular docking and in vitro evaluation of a new hybrid molecule (JM-20) on cholinesterase activity from different sources. **Biochimie**, 168, p. 297-306, Jan 2020.

DOMINGUINI, D.; STECKERT, A. V.; MICHELS, M.; SPIES, M. B. *et al.* The effects of anaesthetics and sedatives on brain inflammation. **Neurosci Biobehav Rev**, 127, p. 504-513, Aug 2021.

DUMAN, R. S.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J. H. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. **Neuron**, 102, n. 1, p. 75-90, Apr 3 2019.

FALCO-WALTER, J. Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. **Semin Neurol**, 40, n. 6, p. 617-623, Dec 2020.

FIGUEREDO, Y. N.; RODRIGUEZ, E. O.; REYES, Y. V.; DOMINGUEZ, C. C. *et al.* Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20: a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule. **Neurol Res**, 35, n. 8, p. 804-812, Oct 2013.

FONSECA-FONSECA, L. A.; WONG-GUERRA, M.; RAMIREZ-SANCHEZ, J.; MONTANO-PEGUERO, Y. *et al.* JM-20, a novel hybrid molecule, protects against rotenone-induced neurotoxicity in experimental model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, 690, p. 29-35, Jan 18 2019.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. **Trends Immunol**, 41, n. 9, p. 805-819, Sep 2020.

GOSSELET, F.; LOIOLA, R. A.; ROIG, A.; ROSELL, A. *et al.* Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. **Neurochem Int**, 144, p. 104952, Mar 2021.

HUBRECHT, R. C.; CARTER, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. **Animals (Basel)**, 9, n. 10, Sep 30 2019.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **J Appl Toxicol**, 37, n. 1, p. 50-59, Jan 2017.

JIN, Y.; JORGENSEN, E.; HARTWIEG, E.; HORVITZ, H. R. The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-25* encodes glutamic acid decarboxylase and is required for synaptic transmission but not synaptic development. **J Neurosci**, 19, n. 2, p. 539-548, Jan 15 1999.

JORGENSEN, E. M. Gaba. **WormBook**, p. 1-13, Aug 31 2005.

LI, X.; WEI, S.; NIU, S.; MA, X. *et al.* Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis. **Comput Biol Med**, 144, p. 105389, May 2022.

MARKAKI, M.; TAVERNARAKIS, N. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. **Curr Opin Biotechnol**, 63, p. 118-125, Jun 2020.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **J Med Chem**, 48, n. 21, p. 6523-6543, Oct 20 2005.

NUNEZ-FIGUEREDO, Y.; PARDO-ANDREU, G. L.; RAMIREZ-SANCHEZ, J.; DELGADO-HERNANDEZ, R. *et al.* Antioxidant effects of JM-20 on rat brain mitochondria and synaptosomes: mitoprotection against Ca(2)(+)-induced mitochondrial impairment. **Brain Res Bull**, 109, p. 68-76, Oct 2014.

NUNEZ-FIGUEREDO, Y.; PARDO ANDREU, G. L.; OLIVEIRA LOUREIRO, S.; GANZELLA, M. *et al.* The effects of JM-20 on the glutamatergic system in synaptic vesicles, synaptosomes and neural cells cultured from rat brain. **Neurochem Int**, 81, p. 41-47, Feb 2015.

NUNEZ-FIGUEREDO, Y.; RAMIREZ-SANCHEZ, J.; DELGADO-HERNANDEZ, R.; PORTO-VERDECIA, M. *et al.* JM-20, a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule, protects mitochondria and prevents ischemic insult-mediated neural cell death in vitro. **Eur J Pharmacol**, 726, p. 57-65, Mar 5 2014.

NUNEZ-FIGUEREDO, Y.; RAMIREZ-SANCHEZ, J.; HANSEL, G.; SIMOES PIRES, E. N. *et al.* A novel multi-target ligand (JM-20) protects mitochondrial integrity, inhibits brain excitatory amino acid release and reduces cerebral ischemia injury in vitro and in vivo. **Neuropharmacology**, 85, p. 517-527, Oct 2014.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Int J Mol Sci**, 20, n. 18, Sep 4 2019.

RAMIREZ-SANCHEZ, J.; SIMOES PIRES, E. N.; NUNEZ-FIGUEREDO, Y.; PARDO-ANDREU, G. L. *et al.* Neuroprotection by JM-20 against oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices: Involvement of the Akt/GSK-3beta pathway. **Neurochem Int**, 90, p. 215-223, Nov 2015.

RAND, J. B. Acetylcholine. **WormBook**, p. 1-21, Jan 30 2007.

SALLARD, E.; LETOURNEUR, D.; LEGENDRE, P. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. **Cell Mol Life Sci**, 78, n. 13, p. 5341-5370, Jul 2021.

SANTOS, C. C.; CARDIM-PIRES, T. R.; SHVACHIY, L.; FONSECA-FONSECA, L. A. *et al.* JM-20, a Benzodiazepine-Dihydropyridine Hybrid Molecule, Inhibits the Formation of Alpha-Synuclein-Aggregated Species. **Neurotox Res**, 40, n. 6, p. 2135-2147, Dec 2022.

SCHUSKE, K.; BEG, A. A.; JORGENSEN, E. M. The GABA nervous system in *C. elegans*. **Trends Neurosci**, 27, n. 7, p. 407-414, Jul 2004.

SEARS, S. M.; HEWETT, S. J. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance. **Exp Biol Med (Maywood)**, 246, n. 9, p. 1069-1083, May 2021.

SHEN, Y.; WEN, Q.; LIU, H.; ZHONG, C. *et al.* An extrasynaptic GABAergic signal modulates a pattern of forward movement in *Caenorhabditis elegans*. **Elife**, 5, May 3 2016.

SILLS, G. J.; ROGAWSKI, M. A. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. **Neuropharmacology**, 168, p. 107966, May 15 2020.

TALEVI, A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective. **Front Pharmacol**, 6, p. 205, 2015.

THAPLIYAL, S.; BABU, K. C. *elegans* Locomotion: Finding Balance in Imbalance. **Adv Exp Med Biol**, 1112, p. 185-196, 2018.

VERMA, M.; LIZAMA, B. N.; CHU, C. T. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. **Transl Neurodegener**, 11, n. 1, p. 3, Jan 25 2022.

WEHRWEIN, E. A.; ORER, H. S.; BARMAN, S. M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. **Compr Physiol**, 6, n. 3, p. 1239-1278, Jun 13 2016.

WONG-GUERRA, M.; JIMENEZ-MARTIN, J.; FONSECA-FONSECA, L. A.; RAMIREZ-SANCHEZ, J. *et al.* JM-20 protects memory acquisition and consolidation on scopolamine model of cognitive impairment. **Neurol Res**, 41, n. 5, p. 385-398, May 2019.