



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MATTEUS TEIXEIRA GUERRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATOCIDA DA α -TUJONA EM *Caenorhabditis elegans*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA/RS

2024

MATTEUS TEIXEIRA GUERRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DA α -TUJONA EM *Caenorhabditis elegans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador(a): Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila

Coorientador(a): Dra. Natália da Silva Jardim

URUGUAIANA/RS

2024

MATTEUS TEIXEIRA GUERRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DA α -TUJONA EM *Caenorhabditis elegans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: 26, julho e 2024.

Banca examinadora:

Profa. Dra Daiana Silva de Ávila
Orientadora
UNIPAMPA

Dra. Viviane de Souza Magalhães
UFRRJ

Profa. Dra. Cleci Menezes Moreira
UNIPAMPA



Assinado eletronicamente por **DAIANA SILVA DE AVILA, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 26/07/2024, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Viviane de Souza Magalhães, Usuário Externo**, em 26/07/2024, às 22:20, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **CLECI MENEZES MOREIRA, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 27/07/2024, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1503016** e o código CRC **820B4131**.

G934a Guerra, Matteus Teixeira
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DA -TUJONA EM
Caenorhabditis elegans / Matteus Teixeira Guerra.
66 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2024.

"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. Bioquímica. 2. Toxicologia. I. Título.

*Dedico esse trabalho a todos que estiveram ao meu
lado durante essa caminhada...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, e dedico esse trabalho aos pilares da minha vida e sem os quais a mesma não teria sentido: Meus pais, Adão e Rejane, meus irmãos, Octávio, Joaquin, Maria e Samuel. Ao meu amor, Juliane, por estar ao meu lado em parte desta trajetória. Pessoas as quais são exemplos de amor e apoio incondicional.

Agradeço imensamente a todos meus colegas de laboratório pelo apoio durante a realização desse trabalho, principalmente a Natália e Júlia, pelo apoio e participação nesse trabalho.

Agradeço infinitamente a professora Daiana pela oportunidade de fazer parte do GBTOXCe e fazer aquilo que amo.

“Sempre nos definimos pela capacidade de superar o impossível”

Autor desconhecido

RESUMO

As infecções parasitárias afetam aproximadamente 2 bilhões de pessoas globalmente, apresentando sintomas clínicos como desnutrição, anemia e diarreia, enquanto comprometem o sistema imunológico, tornando os indivíduos mais suscetíveis a infecções secundárias. A resistência dos parasitas aos medicamentos atuais demanda pesquisa de novos fármacos, como a promissora α -tujona. A α -tujona é encontrada em plantas como *Artemisia absinthium* e *Salvia officinalis*, exibindo efeitos neurotóxicos, tornando-se um candidato potencial para tratamento anti-helmíntico. No entanto, o desenvolvimento de novos medicamentos enfrenta desafios, incluindo o acesso aos estágios relevantes do ciclo de vida do parasita. Portanto, o uso de *Caenorhabditis elegans* como modelo alternativo oferece vantagens no estudo dos efeitos anti-helmínticos, dada sua semelhança com nematoides parasitas e conservação dentro do filo Nematoda. Neste estudo, exploramos o potencial anti-helmíntico da α -tujona utilizando o modelo *C. elegans*. Os vermes foram expostos a um tratamento crônico de α -tujona (0.5, 0.75, 1 e 1.5 Mm) e 48h após foram submetidos as análises para avaliar o potencial nematicida. A α -tujona foi capaz de diminuir a sobrevivência, produção de ovos e o tamanho da ninhada em cepas N2 em concentrações de 1,0 mM e 1,5 mM, além de reduzir a motilidade do verme a uma concentração de 1,5 mM. Em cepas resistentes a anti-helmínticos comerciais, α -tujona exibiu efeitos variados: a cepa resistente a ivermectina mostrou-se susceptível aos efeitos de α -tujona, enquanto cepas resistentes a levamisol e monepantel demonstraram alguma resistência, apresentando apenas redução na motilidade do nematoide. Através de nossas análises, observamos um potencial nematicida em α -tujona, indicando que poderia ser uma alternativa para cepas resistentes a ivermectina, o que sugere que α -tujona necessita do sistema colinérgico para atuar.

Palavras-Chave: Anti-helmíntico, parasitos, *Artemisia absinthium*, *Salvia officinalis*, GABA

ABSTRACT

Parasitic infections affect approximately 2 billion people globally, presenting clinical symptoms such as malnutrition, anemia, and diarrhea, while compromising the immune system and rendering individuals more susceptible to secondary infections. The resistance of parasites to current drugs necessitates the exploration of new therapeutics, such as the promising α -thujone. α -thujone is found in plants like *Artemisia absinthium* and *Salvia officinalis*, exhibiting neurotoxic effects and emerging as a potential candidate for anti-helminthic treatment. However, developing new medications faces challenges, including accessing relevant stages of the parasite's life cycle. Therefore, utilizing *Caenorhabditis elegans* as an alternative model offers advantages in studying anti-helminthic effects, given its similarity to parasitic nematodes and conservation within the Nematoda phylum. In this study, we explore the anti-helminthic potential of α -thujone using the *C. elegans* model. Worms were exposed to chronic α -thujone treatment (0.5, 0.75, 1, and 1.5 mM), and 48 hours later, were subjected to analyses to assess nematicide potential. α -thujone was capable of reducing survival, egg production, and brood size in N2 strains at concentrations of 1.0 mM and 1.5 mM, as well as decreasing worm motility at a concentration of 1.5 mM. In strains resistant to commercial anti-helminthics, α -thujone exhibited varied effects: the ivermectin-resistant strain showed susceptibility to α -thujone effects, while levamisole and monepantel-resistant strains demonstrated some resistance, exhibiting only reduced nematode motility. Through our analyses, we observed nematicide potential in α -thujone, suggesting it could be an alternative for ivermectin-resistant strains, implying that α -thujone requires the cholinergic system to act.

Keywords: Anthelmintic, Parasites, *Artemisia absinthium*, *Salvia officinalis*, GABA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura Química Tujona.....	22
Figura 2 – Isômeros da Tujona	23
Figura 3 – Ciclo de vida <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
Figura 4 – Sistema GABA em <i>C. elegans</i>	29
Figura 5 – Sistema neuromuscular <i>C. elegans</i>	30
Figura 6 – Efeito da alfa-tujona na sobrevivência em <i>C. elegans</i>	39
Figura 7 – Efeito da alfa-tujona no tamanho corporal de <i>C. elegans</i>	41
Figura 8 – Efeito da alfa-tujona na produção de ovos em <i>C. elegans</i>	42
Figura 9 – Efeito da alfa-tujona no tamanho de ninhada em <i>C. elegans</i>	43
Figura 10 – Efeito da alfa-tujona na apoptose germinativa em <i>C. elegans</i>	44
Figura 11 – Efeito da alfa-tujona na motilidade em <i>C. elegans</i>	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.1 OBJETIVO GERAL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4. REFERENCIAL TEÓRICO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1 PARASITOSSES E OS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	19
4.2 TUJONA.....	21
4.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> E SEU USO COMO MODELO PARA AVALIAÇÃO NEMATOCIDA	24
4.4 SISTEMA GABA EM <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
4.5 SISTEMA COLINÉRGICO EM <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	30
5. MATERIAIS, METODOS E RESULTADOS	32
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. PERSPECTIVAS	54
8. REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por parasitos são um dos principais agravos por processos infecciosos no mundo, afetando cerca de 2 bilhões de pessoas em todos os continentes (Andrade et al., 2011). Essas parasitoses podem ter diversas manifestações clínicas como desnutrição, anemia, irritabilidade e diarreia, além de debilitar o sistema imune do infectado deixando-o mais suscetível a contrair outras infecções (Andrade et al., 2017; Isaac et al., 2019). O número de infecções causadas por parasitos em uma escala global vem aumentando, estima-se que 1,5 bilhão de pessoas estejam infectados com *Ascaris lumbricoides*, 1,3 bilhão com *Trichuris trichiura*, 1,05 bilhão com Ancilostomídeos, 200 milhões com *Entamoeba histolytica* e 400 milhões com *Giardia duodenalis*. No continente americano o parasito mais prevalente identificado foi *Ascaris lumbricoides*, acometendo cerca de 30% da população (Andrade et al., 2011; Curval et al., 2017; Isaac et al., 2019; Scholte et al., 2015).

Além de afetar os seres humanos, as helmintíases também acometem os animais e os vegetais. Em animais são responsáveis por grandes prejuízos econômicos no setor agropecuário, já que podem causar redução na produtividade, diminuição da fertilidade, atraso no crescimento e elevados gastos veterinários (Dilks et al., 2020; Tileubayeva et al., 2021). Nematoides fitoparasitários podem afetar o sistema radicular das plantas e reduzir a produtividade de cultivos agrícolas, além de atuar como transmissores de outros patógenos de plantas (Mandal et al., 2021; Tileubayeva et al., 2021).

Em países subdesenvolvidos, como o Brasil, as condições climáticas, falta de políticas públicas e fatores socioeconômicos contribuem para a manutenção e proliferação de focos endêmicos destes nematoide (Andrade et al., 2017; Teixeira et al., 2020). Apesar dos enormes impactos causados por esses parasitos, existe apenas um repertório pequeno de drogas disponíveis para o tratamento das helmintíases, tanto no setor agropecuário e veterinário quanto para humanos. O uso excessivo dos mesmos medicamentos levou a resistência desses helmintos, gerando a necessidade da pesquisa de novos medicamentos para combater esse tipo de infecção (Castro et al., 2021; Dilks et al., 2020; Linda M Pallotto et al., 2022). Existe ainda um processo de transmissão amplificado por parte dos helmintos, pois é conhecida a resistência de seus ovos a

agentes terapêuticos, detergentes e desinfetantes de uso doméstico e à radiação ultravioleta. Essa característica dos helmintos faz com que ambientes públicos de grande circulação de pessoas representem um potencial de transmissão destes parasitos resistentes (de Andrade et al., 2010; Massara et al., 2003; Scholte et al., 2015).

A Ivermectina, um dos principais medicamentos utilizados contra parasitoses, tem sua resistência associada aos mecanismos de regulação de alguns genes envolvidos no transporte de xenobióticos, como os inibidores da glicoproteína-P ou genes associados ao metabolismo de biotransformação de enzimas como: citocromo oxidase P450 e glutathione S-transferases (Reyes-Guerrero et al., 2023). Os Benzimidazóis têm sua resistência causada por polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no gene da β -tubulina, sendo principalmente as trocas nos aminoácidos F200Y, F167Y, e em alguns casos podendo ocorrer no aminoácido E198A (Özben et al., 2022; Linda M Pallotto et al., 2022). O Levamisol atua como agonista dos canais receptores de acetilcolina (nAChR) nas células musculares, e com base na observação de alguns parasitos, a resistência se dá no defeito de transcrição do gene *hco-acr-8* (*hco-acr-8b*) como um resultado da deleção (63bp) no íntron 2 (Baltrušis et al., 2021). Além disso, Monepantel é um dos nematocidas mais recentes registrados no mundo, esse composto é um derivado de amino-acetonitrila e tem demonstrado um amplo espectro contra nematoides gastrointestinais. Esse fármaco tem como alvo receptores nicotínicos de acetilcolina da subfamília DEG-3 específica em nematoides, estudos demonstraram que mutações em *Hco-mptl-1* e *Hco-des-2H* podem gerar perda de função dos receptores, gerando uma resistência a esse fármaco (Bagnall et al., 2017; Rufener et al., 2013).

Devido a essas resistências, novas moléculas vêm sendo estudadas, dentre elas destacam-se os derivados de produtos naturais (Ndjonka et al., 2014; Pineda-Alegria et al., 2017). Plantas medicinais são amplamente utilizadas na medicina tradicional ao redor do mundo, e algumas surgem como alternativa para o tratamento de helmintíases e outras parasitoses como a *Artemisia absinthium* e *Salvia officinalis*. *A. absinthium* é muito utilizada na medicina tradicional africana e asiática, principalmente para tratar inflamação, tosses, resfriados, malária, febre, gripe e diabetes. Além disso essa erva medicinal é conhecida desde a época do Egito antigo devido ao seu potencial anti-helmíntico (Buza et al., 2020; Hold et al., 2000; Lachenmeier, Walch, et al., 2006;

Pelkonen et al., 2013). O medo gerado pelo absintismo, uma síndrome caracterizada por crises epiléticas e alucinações, ocasionou uma diminuição do seu uso, sendo essa síndrome atribuída à tujona, presente principalmente no óleo essencial da planta (Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013; Sharifi-Rad et al., 2022). Existem poucos estudos que relatam o uso de *A. absinthium* como um agente antiparasitário, porém é conhecido o uso contra nematoides gastrointestinais ovinos (Tariq et al., 2009), *Trichinella spiralis* (Caner et al., 2008), *Toxocara catti* (YILDIZ et al., 2011), *Fasciola hepática* (Ferreira et al., 2011), *Hymenolepis nana* (Beshay, 2018). Assim como a *A. absinthium*, a *S. officinalis* é uma planta muito utilizada na medicina tradicional do oriente médio, principalmente pela sua propriedade antibacteriana e anti-helmíntica (Krishnaiah et al., 2011; Miraj & Kiani, 2016; Yones et al., 2011). Existem poucos estudos clínicos que comprovam sua eficácia, como por exemplo, seu uso no âmbito veterinário foi testado contra o platelminto *Echinococcus granulosus* (Yones et al., 2011), e para endoparasitas presentes em cães, gatos e porcos (Lans et al., 2007). A fração terpênicica dessa planta é responsável por suas principais funções terapêuticas, tendo a tujona um de seus componentes identificados (Arceusz et al., 2013).

A tujona está presente em diversas plantas, sendo um dos compostos majoritários da *A. absinthium* e *S. officinalis* e um componente importante em medicamentos fitoterápicos (Băieș et al., 2022; Beshay, 2018; Pelkonen et al., 2013; Yones et al., 2011). Seu efeito neurotóxico é amplamente conhecido, embora o seu risco para seres humanos seja mínimo. Em estudos com animais se descobriu o seu mecanismo de ação pela inibição o receptor do ácido gama-aminobutírico A (GABA_A), causando excitação e convulsões de maneira dependente da dose. A tujona atua tanto como um modulador de ação rápida do canal de cloreto regulado por GABA, afetando principalmente as propriedades de abertura e fechamento desse canal, quanto com ação inibitória da frequência pós-sináptica (Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013; Rivera et al., 2014).

O desenvolvimento de novos fármacos conta com a dificuldade em acessar os estágios relevantes do ciclo de vida dos parasitos, gerando um alto custo e processos altamente complexos. Para contornar algumas dessas limitações será utilizado o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, um organismo que já vem sendo utilizado para estudar questões científicas relacionadas a nematoides parasitários

(Castro et al., 2020; Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. J. Walker, 2014; Linda M Pallotto et al., 2022; Risi et al., 2019). O *C. elegans* apresenta uma grande semelhança com as principais características genética, fisiológicas e bioquímicas dos nematoides parasitas como o tipo de cutícula, os sistemas nervoso e neuromuscular, onde em *C. elegans* há uma abundância de neuropeptídeos que em parasitos regulam processos vitais como alimentação, locomoção e postura de ovos, além de outros aspectos fisiológicos (L. Holden-Dye & R. Walker, 2014; Risi et al., 2019). O *C. elegans* é um modelo *in vivo* utilizado em ensaios de triagem para farmacologia e toxicologia. Esse modelo apresenta diversas vantagens, como: baixo custo de manutenção; rápida reprodução e possibilidade de monitorar todo seu desenvolvimento larval. Além disso, também foi o primeiro ser vivo a ter seu genoma e transcriptoma completamente sequenciado e caracterizado. Esse verme é um pequeno nematoide, que no seu estágio adulto pode medir cerca de 1 mm de comprimento, e pode ser manuseado usando técnicas similares às *in vitro* (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014; Rodrigues et al., 2024).

Devido ao alto grau de conservação dentro do filo Nematoda, é possível avaliar a motilidade, reprodução e alterações em neurotransmissores como acetilcolina, glutamato e GABA (Burns et al., 2015; Hahnel et al., 2020). Além da semelhança no âmbito molecular, os efeitos causados pelos anti-helmínticos mais utilizados são comuns no sistema neuromuscular entre *C. elegans* e os parasitos membros do filo Nematoda. Uma sobreposição genética com os principais parasitas do filo gera mais segurança para o uso do modelo, por exemplo, *Ascaris suum* e *Haemonchus contortus* possuem cerca de 67-69% de seus genes similares com o *C. elegans* (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. J. Walker, 2014; Risi et al., 2019). A cutícula enriquecida com colágeno forma a camada mais externa da pele do verme, e a perda de colágenos específicos pode levar ao aumento da suscetibilidade dos nematoides a drogas anti-helmínticas (Burns et al., 2015; Hahnel et al., 2020; Vlaar et al., 2021). O *C. elegans* tem um estágio de vida dividido em quatro estágios larvais, chamados L1 a L4, porém um estágio de “dormência” pode ocorrer quando o verme está exposto em condições adversas como aglomeração, falta de alimento ou altas temperaturas, chamado de larva dauer (Vlaar et al., 2021; White et al., 2019).

Levando-se em conta a crescente resistência aos medicamentos atualmente disponíveis para tratar parasitoses e as propriedades da tujona (Andrade et al., 2017; Pelkonen et al., 2013), o objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos anti-helmínticos desta molécula utilizando o modelo alternativo *C.elegans* tipo selvagem e suas cepas mutantes resistentes aos principais medicamentos anti-helmínticos disponíveis no mercado, permitindo que, dessa forma, sua eficácia e mecanismo pudessem também ser avaliados.

1. JUSTIFICATIVA

O panorama global das parasitoses continua a representar um desafio significativo para a saúde pública, causando uma variedade de sintomas debilitantes e perdas importantes na produtividade econômica, especialmente na agricultura e pecuária, exigindo investimentos elevados para tratamentos agrícolas e veterinários. Além disso a resistência crescente aos poucos medicamentos disponíveis para tratar essas infecções agrava ainda mais o risco gerado por parasitos, destacando a necessidade urgente de encontrar novos agentes terapêuticos eficazes.

O modelo experimental *C. elegans* surge como uma ferramenta consolidada para abordar esses desafios, já que esse nematoide de vida livre compartilha uma alta conservação genética com parasitos do filo nematoda, como *Ascaris suum* e *Haemonchus contortus*, o que o torna um modelo ideal para estudar a ação nematicida e como cepas resistentes aos medicamentos disponíveis respondem ao tratamento proposto neste estudo. A utilização desse modelo alternativo e a disponibilidade de cepas mutantes resistentes podem proporcionar informações valiosas sobre novos alvos terapêuticos e estratégias de tratamento para parasitoses especialmente diante da resistência observada em medicamentos como a ivermectina, levamisol e os mais recentes derivadas do amino-acetonitrilo (AADs), permitindo identificar compostos que possam superar essas barreiras.

A tujona, um componente encontrado em plantas utilizadas na medicina tradicional como tratamento de parasitoses, é um candidato potencial para o tratamento nematicida e amplia o escopo do estudo para explorar terapias baseadas em produtos

naturais. A tujona possui propriedades conhecidas como modulador do receptor GABA_A, podendo representar uma abordagem alternativa promissora contra parasitos. Portanto o estudo proposto não apenas aborda uma necessidade crítica de saúde pública e agrícola, mas também capitaliza avanços científicos recentes para avançar na descoberta de novos tratamentos contra parasitoses. Ao utilizar *C. elegans* como modelo experimental e investigar o potencial terapêutico da tujona, este trabalho se justifica por contribuir significativamente para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e sustentáveis no combate a infecções parasitárias.

2. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito nematicida do tratamento crônico da α -tujona em modelo alternativo *C. elegans*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos nematicidas da α -tujona em *C. elegans* do tipo selvagem;
- Verificar se a exposição à α -tujona altera parâmetros fisiológicos dos vermes tipo selvagem;
- Avaliar os efeitos da α -tujona em cepas mutantes de *C. elegans* resistentes aos principais fármacos disponíveis para o tratamento de helmintíases e, com isso, prever o mecanismo dessa cetona monoterpênica.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 PARASITOSSES E OS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA

Doenças causadas por um organismo que necessitam de um hospedeiro são chamadas parasitoses, e representam um problema de saúde pública de grande relevância principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (Karakus et al., 2022; Tahar et al., 2021). Estimativas indicam que 2 bilhões de pessoas podem estar infectadas com algum tipo de parasito no mundo, gerando um impacto significativo na qualidade de vida dessas pessoas e no desenvolvimento socioeconômico das populações afetadas (Andrade et al., 2017; Karakus et al., 2022).

As espécies de parasitos são extremamente diversas, podendo infestar diferentes órgãos e sistemas do corpo humano causando doenças mais brandas ou que podem até mesmo levar a morte, dependendo da espécie, carga parasitária e resposta imunológica do hospedeiro (Andrade et al., 2017; Curval et al., 2017; Tahar et al., 2021). Entre os principais grupos de parasitos causadores de doenças humanas podemos destacar os helmintos: *Ascaris lumbricoides* (Hagel & Giusti, 2010), *Enterobius vermicularis* (Fantinatti & Da-Cruz, 2023), *Strongyloides stercoralis* (Schar et al., 2013) e *Trichuris trichiura* (Ok et al., 2009).

Essas helmintíases podem ter diversos modos de transmissão variando de acordo com a espécie e suas características biológicas. Alguns helmintos liberam seus ovos ou larvas nas fezes e a transmissão ocorre com a ingestão desses materiais através da água, alimentos ou contato direto com superfícies contaminadas (Andrade et al., 2017; Massara et al., 2003). Outras espécies podem contaminar o hospedeiro através da penetração da pele, quando entram em contato com solo contaminado, principalmente em áreas onde a higiene é precária (Scholte et al., 2015; Teixeira et al., 2020). Além disso é conhecida a contaminação de alguns parasitos através da ingestão de carnes cruas ou mal-cozidas, principalmente as carnes de peixe e porco (Dixon et al., 2021). A transmissão vertical é outro método de contaminação, onde a mãe pode transmitir para o filho durante a gestação ou no parto (Schar et al., 2013; Wikman-Jorgensen et al., 2021).

Essas parasitoses intestinais podem causar diversos sintomas que variam na sua gravidade. Os sintomas mais comuns incluem diarreia, dor abdominal, distensão abdominal pela obstrução intestinal causado por helmintos, perda de peso, anemia ferropriva, e comprometimento do crescimento e desenvolvimento em crianças (Andrade et al., 2017; Curval et al., 2017; de Andrade et al., 2010). Além dos efeitos diretos na saúde física dos pacientes, as parasitoses intestinais podem predispor os indivíduos a outros tipos de infecções como por exemplo, bacterianas, elevando a morbidade e mortalidade em populações vulneráveis (Isaac et al., 2019; Karakus et al., 2022; Tahar et al., 2021).

A longo prazo, as consequências das parasitoses intestinais incluem impactos negativos no desenvolvimento cognitivo e educacional de crianças afetadas, além de perpetuar o ciclo de pobreza e desigualdade (Hajissa et al., 2022; Karakus et al., 2022; Tahar et al., 2021). O impacto econômico é importante quando se trata de parasitoses intestinais, pois está diretamente relacionada a pobreza, falta de saneamento básico e estrutura sanitária, além de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento desses parasitos. As parasitoses podem gerar altos custos diretos com cuidados de saúde, tratamento medicamentoso e custos indiretos a perda de produtividade no trabalho e diminuição da produtividade escolar em crianças (Andrade et al., 2011; Hajissa et al., 2022; Teixeira et al., 2020).

O uso indiscriminado e inadequado de medicamentos anti-helmínticos contribui significativamente para o desenvolvimento de resistência parasitária. Além disso existe apenas um pequeno repertório de medicamentos disponíveis para o tratamento dessas infecções (Reyes-Guerrero et al., 2023). O Albendazol é um medicamento utilizado para o tratamento de várias infecções causadas por helmintos como *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*, interferindo no metabolismo dos helmintos, através da inibição da polimerização tubulínica, ocasionando uma alteração nos níveis de energia do parasito causando uma imobilização e posteriormente a morte por esgotamento de reservas energéticas (Chai et al., 2021; Dilks et al., 2020).

O levamisol, outro medicamento disponível, é utilizado para o tratamento principalmente de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. O Levamisol atua como agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina nos nervos e músculos do nematoide,

levando a despolarização neuromuscular e paralisia dos parasitas, que por fim serão eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro (Baltrušis et al., 2021; McHugh et al., 2020).

A ivermectina um medicamento anti-helmíntico com o objetivo de tratar infecções causadas por *Ascaris lumbricoides*, *Onchocerca volvulus* e outros parasitos. Atua como agonista dos canais de cloro sensíveis ao glutamato presente nas células musculares dos parasitos causando paralisia e eliminação pelo hospedeiro (Basanez et al., 2008; Johnson-Arbor, 2022).

O Monepantel é um antiparasitário de uso restrito veterinário e de desenvolvimento mais recente, pertence a classe dos AADs, utilizado especificamente em infecções causadas por nematoides resistentes aos benzimidazois, como em algumas espécies de *Haemonchus contortus* e *Teladorsagia* em animais. Esse medicamento atua como modulador alostérico dos receptores nicotínicos do tipo DEG-3/DES-2 em várias espécies de nematoides, e em alguns estudos é relatada a ação de hipercontração do músculo em alguns nematoides (Abongwa et al., 2018; Canton et al., 2023; Rufener et al., 2013).

Esses parasitos demonstram uma preocupação crescente, especialmente em áreas onde há falta de regulamentação no uso desses medicamentos, e também acesso limitado a alternativas terapêuticas. A falha no tratamento para essas parasitoses devido a resistência desenvolvida pode também levar a complicações de saúde prolongadas, custos adicionais em saúde pública e a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas (Andrade et al., 2017; Băieș et al., 2022; Baltrušis et al., 2021).

4.2 TUJONA

A tujona, uma cetona monoterpênica bicíclica saturada, é um composto presente em diversas plantas, podendo ser encontrado em muitos produtos como suplementos dietéticos e medicinais à base de ervas (Pelkonen et al., 2013; Zámoriné Németh & Thi Nguyen, 2020). Essa cetona é conhecida por suas propriedades controversas e uma potencial toxicidade, ganhando notoriedade principalmente pelo seu papel histórico na crise do absintismo, uma vez que a tujona é um componente importante do absinto, uma

bebida famosa no século XIX (Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Lachenmeier, Walch, et al., 2006; Pelkonen et al., 2013).

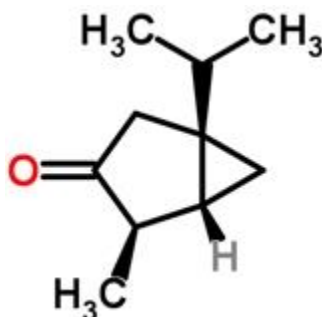


Figura 1 – Estrutura Química da Tujona (Fonte: PubChem).

O Absinto foi uma bebida espiritual criada na Suíça no final do século XVIII, onde a erva *Artemisia absinthium* L., usada normalmente como medicina tradicional desde o Egito antigo, foi misturada a outras ervas para dar sabor a bebida. Ao final do século XIX o absinto já era chamado popularmente como “fada verde” (*feé verte*), se tornando a bebida mais popular na Europa (Chapuis, 2013; Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Lachenmeier, Walch, et al., 2006). A bebida se tornou um elemento rotineiro em bares e cafés europeus, tendo culturalmente seu momento de degustação chamado “hora verde”. O abuso crônico dessa bebida gerou um grande problema de saúde pública na Europa, que foi nomeada como a “síndrome do absintismo”, gerando diversos sintomas após o consumo da bebida como: alucinações, depressão, convulsões, cegueira e deterioração mental, sendo que em casos de abusos extremos da bebida esses sintomas podiam resultar até na morte do consumidor (Lachenmeier, Walch, et al., 2006; Padosch et al., 2006).

Por um longo período, as propriedades tóxicas do absinto foram atribuídas ao óleo de losna, cujo composto majoritário é a tujona (Lachenmeier, Emmert, et al., 2006). A bebida teve sua proibição decretada na Europa a partir de 1905. Apenas em 1988, através de um acordo com os estados membros do conselho europeu, as leis foram relativizadas ao uso de aromatizantes para uso em alimentos e matérias-primas para produção utilizando plantas contendo tujona. Em 1990, o absinto voltou a ser comercializado em toda a união europeia e foi introduzido um limite máximo de 35 mg/kg

de tujona por dia (Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Lachenmeier, Walch, et al., 2006). Apesar do medo gerado com a volta do absinto, foi evidenciado que muitos dos sintomas na verdade seriam atribuíveis à adulteração da bebida com plantas tóxicas como a *Acorus calamus L.* e *Tanacetum vulgare L.*, além de adulterações com cloreto de antimônio e sulfato de cobre. Estudos indicam que a ingestão de cobre associada ao álcool tem sua absorção amplificada, podendo levar a cirrose alcoólica (Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Lachenmeier, Walch, et al., 2006; Pelkonen et al., 2013).

Devido a sua natureza química, onde sua estrutura química é composta por um anel de seis membros contendo uma carbonila, a tujona possui propriedades lipofílicas importantes, permitindo interações específicas com diversos receptores e enzimas no organismo, podendo gerar efeitos biológicos no organismo. Além disso, a tujona pode se apresentar nos isômeros α -tujona e β -tujona, sendo o primeiro cerca de 2 a 3 vezes mais potente em sua ação (Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013; Zámoriné Németh & Thi Nguyen, 2020).

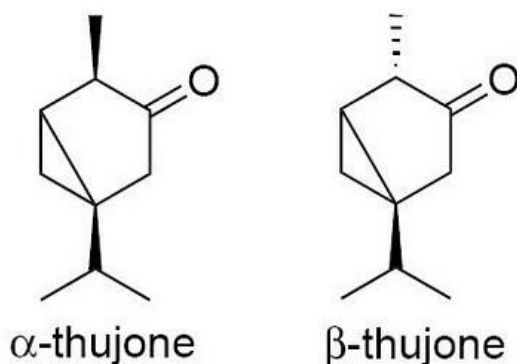


Figura 2 – Isômeros da Tujona. Fonte: Zámoriné Németh and Thi Nguyen (2020)

A toxicidade da tujona tem sido amplamente estudada e gerado um grande interesse científico. O mecanismo da α -tujona foi estudado de maneira convincente em animais experimentais como roedores e também células neuronais, levando ao entendimento da ação moduladora de ação rápida dos canais de cloreto controlados por GABA, afetando principalmente as propriedades de abertura e fechamento do canal e a frequência da corrente pós-sináptica (Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, e a ação antagonista

competitiva de compostos como a tujona podem alterar significativamente a excitabilidade neuronal (Rathor et al., 2024; Rivera et al., 2014). Além da modulação do GABA, a tujona também foi estudada quanto a sua ação em receptores canabinoides CB1 e o receptor de serotonina 5-HT₃, embora o mecanismo dessas interações não foi completamente elucidado (Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013). Estudos recentes indicam que a tujona pode atuar como modulador alostérico dos receptores α 7-nACh de maneira dependente da concentração, afetando a função dos canais iônicos sem interferir nos níveis intracelulares de Ca²⁺. Esses estudos demonstram que a ação da tujona pode levar a uma hiperexcitabilidade neuronal, e em concentrações elevadas pode induzir convulsões e outros distúrbios neurológicos graves dependendo da dose administrada (Sultan et al., 2017). Em camundongos, por exemplo, é conhecido que uma dosagem de até 30 mg/kg é confiavelmente segura, já quando dobramos essa concentração ocorre a morte de todos os animais tratados (Hold et al., 2000).

Após a ingestão, a tujona é rapidamente metabolizada pelo fígado, principalmente através do sistema enzimático citocromo P450. Os principais metabólitos gerados por essa reação de metabolização incluem 7-hidroxi- α -tujona e a 4-hidroxi- α -tujona, que são considerados produtos menos tóxicos que a própria tujona e podem ser excretados na forma de conjugados pela urina. A velocidade e a eficiência do metabolismo podem variar entre indivíduos, o que influencia a tolerância e a resposta aos produtos que contêm tujona (Hold et al., 2000; Thamm et al., 2018).

Devido ao seu histórico na crise do absintismo, a preocupação no risco que envolve a utilização da tujona persiste, e a avaliação do uso agudo e também crônico através da dieta e do uso de produtos medicinais é estudado (Lee et al., 2020; Pelkonen et al., 2013). É estimado que a ingestão média e máxima por consumidores europeus está abaixo dos limites de segurança, porém existe preocupação que um pequeno grupo de consumidores ainda pode estar exposto a um valor excessivo de produtos à base de tujona (Chapuis, 2013; Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Lachenmeier, Walch, et al., 2006).

Apesar das preocupações com a toxicidade da tujona, o composto tem sido utilizado historicamente através do óleo de plantas como *Artemisia absinthium* e *Salvia officinalis* para diversas condições como: distúrbios digestivos, parasitoses, inflamações,

infecções fúngicas (Băieș et al., 2022; Beshay, 2018; Miraj & Kiani, 2016; Yones et al., 2011). Embora existam estudos que relatam a importância terapêutica e os benefícios da tujona, é necessário um equilíbrio com os riscos potenciais para a saúde.

4.3 *Caenorhabditis elegans* E SEU USO COMO MODELO PARA AVALIAÇÃO NEMATICIDA

Após a caracterização do modelo pelo biólogo Sydney Brenner em 1960, a utilização de *C. elegans* tem se tornado uma alternativa popular no meio científico (Brenner, 1974; White et al., 1983). O *C. elegans* é um nematoide de vida livre (não parasita) pertencente à família *Rhabditidae* e possui um tamanho pequeno que pode chegar aproximadamente 1 milímetro de comprimento em sua fase adulta. Esse verme pode ser encontrado em matéria orgânica em decomposição, pois a utiliza como fonte de alimento (Hahnel et al., 2020; Hunt, 2017). O modelo vem sendo utilizado e estudado por pesquisadores devido as suas diversas vantagens na pesquisa como seu fácil manuseio e manutenção. No ambiente laboratorial o nematoide *C. elegans* pode ser mantido em placas de petri contendo meio de crescimento para nematoides (NGM – nematode growth medium) e bactéria *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento, e são mantidos em uma temperatura de 20 °C e umidade controlada (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014; Hunt, 2017).

Um dos fatores que aumenta o prestígio desse nematoide é seu curto ciclo de vida, o que contribui para a realização de diferentes análises em um curto período. É possível realizar análises toxicológicas avaliando a sobrevivência e longevidade do verme, motilidade, reprodução, tamanho e área corporal e diversas outras análises (Hunt, 2017; Tejeda-Benitez & Olivero-Verbel, 2016). Após a eclosão dos ovos, o verme possui quatro estágios larvais até atingir o estágio adulto. O nematoide leva cerca de 4 dias para atingir o ápice do seu desenvolvimento, e sua longevidade pode durar cerca de 23 dias dependendo das condições climáticas e laboratoriais (Gieseler et al., 2017; Stiernagle, 2006).

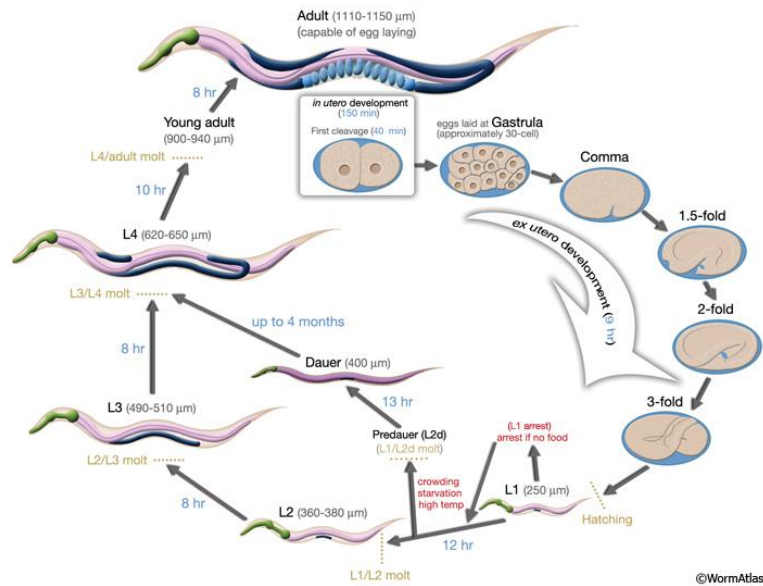


Figura 3 – Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* (Fonte: Worm atlas).

A população desses nematoides são divididas em hermafroditas e machos, sendo a primeira a predominante, chegando a cerca de 99,9% da população. O verme, em seu período reprodutivo, pode realizar a postura de em média 300 a 400 ovos a cada ciclo de vida, tendo o início no seu primeiro dia de adulto, podendo durar até 3 dias (Davis et al., 2023; Hunt, 2017; Stiernagle, 2006). Essa reprodução facilitada e de forma rápida é outra das grandes vantagens da utilização do nematoide *C. elegans* como modelo alternativo, possibilitando analisar os efeitos no sistema reprodutor (Hahnel et al., 2020; Tejeda-Benitez & Olivero-Verbel, 2016).

A grande semelhança do código genético com os humanos torna o nematoide *C. elegans* um modelo extremamente vantajoso para pesquisas envolvendo genética, desenvolvimento e toxicologia, já que cerca de 60-80% dos genes são homólogos aos humanos. Com isso, tornou-se possível obter animais nocautes ou transgênicos (Brenner, 1974; Hahnel et al., 2020). Além disso o verme tem uma cutícula transparente, o que torna possível realizar uma marcação com a proteína verde fluorescente (GFP-green fluorescence protein) contribuindo para a visualização e análise *in vivo* de diversos aspectos, como por exemplo a visualização de corpos apoptóticos das células germinativas e danos neuronais (Gieseler et al., 2017; Wang et al., 2017).

Nematoides parasitos tem um impacto significativo na saúde global e no desenvolvimento socioeconômico. Apesar disso seu controle se dá apenas com um pequeno repertório de classes de drogas químicas disponíveis no mercado, e infelizmente o uso excessivo dessas drogas levou à um desenvolvimento de resistências pelos parasitos principalmente na medicina veterinária e na agricultura (Baltrušis et al., 2021; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014). O surgimento de parasitos resistentes aos medicamentos disponíveis tem aumentado, destacando uma tendência alarmante na necessidade urgente do desenvolvimento de novas drogas inovadoras. O desenvolvimento dessas drogas nematicidas tem desafios como acesso insuficiente a estágios de ciclo de vida relevantes, além do cultivo laboratorial dependente de hospedeiros. Esse tipo de cultivo de parasitos pode ser extremamente custoso financeiramente, além de um tratamento complexo e frágil, com um arsenal limitado de ferramentas moleculares (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014).

Para contornar essas limitações, o nematoide de vida livre *C. elegans* demonstra ser um sistema robusto e confiável para estudar questões relacionadas aos parasitos e a descoberta de novos compostos nematicidas, sendo ele um dos organismos mais bem caracterizados do mundo (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014). Diversos estudos demonstram que *C. elegans* compartilha as principais características do plano corporal dos nematoides parasitos, como a cutícula e a organização do sistema nervoso, além de diversos aspectos fisiológicos (Buckingham et al., 2014; Castro et al., 2020; Fleming et al., 1997; Risi et al., 2019). O sistema neuromuscular demonstra um alto grau de conservação quando comparado com o filo Nematoda, permitindo a formulação de diversas hipóteses e conclusões válidas quando relacionado com a motilidade, postura de ovos e alimentação. Além disso os neurotransmissores altamente conservados como acetilcolina, glutamato e GABA desempenham um papel importante e central nas espécies parasitárias (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014).

Além do controle muscular preservado, através de famílias de neuropeptídeos específicas dos nematoides encontrados em *C. elegans*, os efeitos múltiplos causados por anti-helmínticos no sistema neuromuscular são semelhantes entre *C. elegans* e nematoides parasitos (Holden-Dye et al., 2013; McCoy et al., 2017). Outros aspectos

incluem uma importante sobreposição genética com nematoides parasitos como por exemplo, *Ascaris suum* e *Haemonchus contortus* que tem uma semelhança de 67-69% dos seus genes com *C. elegans*. Todas essas semelhanças apoiam o uso do modelo na pesquisa anti-helmíntica, onde diversas publicações envolvendo *C. elegans* e a busca por novas moléculas nematicidas são conhecidas, confirmando a estabilidade do modelo para esse fim (Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014) .

4.4 SISTEMA GABAérgico EM *Caenorhabditis elegans*

O sistema GABAérgico em *Caenorhabditis elegans* representa uma área de estudo fundamental sobre a neurotransmissão e os mecanismos neurofarmacológicos em nematoides (Barbagallo et al., 2017; Schuske et al., 2004). O GABA (ácido gama-aminobutírico), é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central de muitos organismos, incluindo *C. elegans* e desempenha papéis essenciais na regulação da motilidade, resposta ao estresse, comportamento alimentar e outros processos fisiológicos (Schuske et al., 2004; Thapliyal & Babu, 2018; Zhou & Bessereau, 2019).

A biossíntese de GABA em *C. elegans* envolve a conversão do glutamato em GABA pela enzima glutamato descarboxilase (GAD) codificada pelo gene *unc-25*, sendo uma etapa essencial na biossíntese de GABA, catalisando a reação com o auxílio do gene *unc-46* que codifica uma enzima essencial para esse processo de conversão (Eastman et al., 1999; Jin et al., 1999; Schuske et al., 2007). Além disso, especificação e a diferenciação dos neurônios GABAérgicos estão envolvidas com o gene *unc-30*, o qual atua como um fator de transcrição que regula a expressão de genes críticos para a função desse sistema, além de ser homólogo ao fator de transcrição ASCL1 em humanos, que desempenha papel fundamental na neurogênese e na regulação de células neurais (Correa et al., 2024; Jin et al., 1994; Wohlschlegel et al., 2023).

O transporte e a sinalização do GABA são mediados por transportadores específicos, como UNC-47, que atua na captura de GABA pelas vesículas sinápticas, e o receptor GABA_A, que é composto por subunidades que regulam canais iônicos de cloreto (Bamber et al., 1999; Eastman et al., 1999; McIntire et al., 1993; Zhao et al., 2023). Os genes *unc-49* e *exp-1* desempenham papéis distintos na resposta neural modulada

por GABA. UNC-49 é um receptor metabotrópico de GABA, atuando acoplado à proteína G, fazendo com que sua ativação induza a transdução de sinal através dessa proteína e module vias de sinalização intracelular. Receptores como UNC-49 não formam canais iônicos, mas influenciam indiretamente na atividade neuronal. EXP-1 é um receptor ionotrópico de GABA que se abre ao se ligar com o neurotransmissor permitindo a passagem de íons para dentro da célula, hiperpolarizando a membrana celular e inibindo a transmissão neuronal (Bamber et al., 1999; Bamber et al., 2003; Beg & Jorgensen, 2003).

Os neurônios GABAérgicos em *C. elegans* são distribuídos de maneira específica e sua atividade regula a função neural e comportamental do organismo. Estudos genéticos e de expressão gênica revelaram a importância dos receptores GABA_A em diferentes comportamentos, como locomoção, resposta a estímulos mecânicos e químicos, e modulação da atividade locomotora (Barbagallo et al., 2017; Schuske et al., 2004).

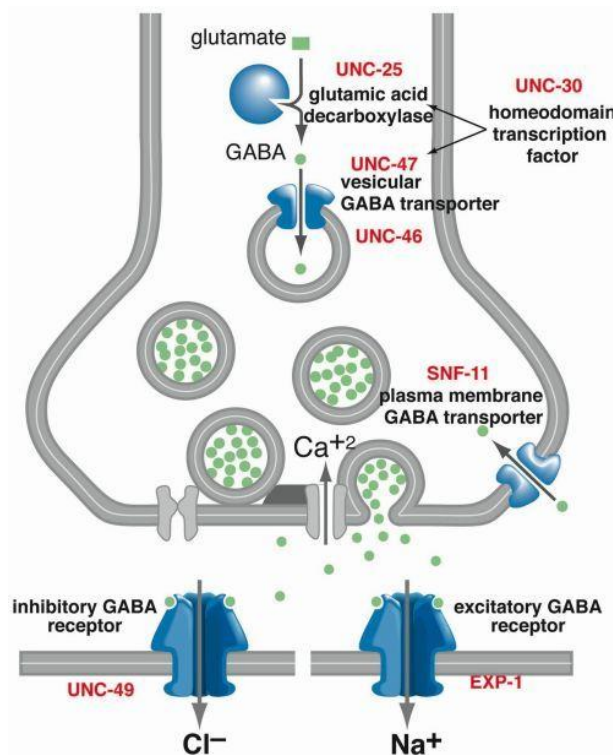


Figura 4 – Sistema GABAérgico em *C. elegans* (Fonte: Worm Book).

A manipulação genética de genes relacionados ao sistema GABAérgico permitiu a caracterização de fenótipos comportamentais em *C. elegans*, incluindo hipomotilidade em mutantes deficientes em GABA, e sua reversão por tratamentos com agonistas de GABA (Gadhia et al., 2024; Schuske et al., 2004). Essas características comportamentais e sua base molecular são cruciais para entender como os sistemas neuronais regulam a resposta a estímulos ambientais e a homeostase interna. Além disso, *C. elegans* tem sido um modelo importante para investigar os efeitos de drogas psicoativas e neurofarmacológicas que afetam o sistema GABAérgico (Nicholl et al., 2017; Reed et al., 2023).

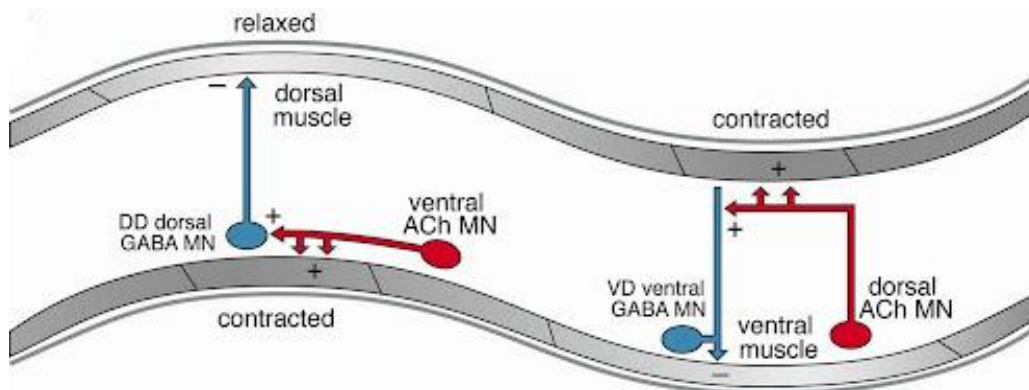


Figura 5 – Sistema neuromuscular em *C. elegans* (Fonte: Worm Book)

A pesquisa sobre o sistema GABAérgico em *C. elegans* não apenas contribuiu para o entendimento fundamental da neurotransmissão e função neuronal, mas também oferece perspectivas importantes para aplicações terapêuticas. A capacidade de manipular geneticamente este organismo e sua resposta a agentes farmacológicos permite investigações detalhadas sobre como são coordenados os comportamentos desse nematoide. Assim, *C. elegans* continua a ser uma ferramenta indispensável para estudos neuronais e farmacológicos.

4.5 SISTEMA COLINÉRGICO EM *Caenorhabditis elegans*

O *C. elegans* possui um sistema colinérgico que regula aspectos cruciais na vida do verme como a motilidade, postura de ovos e a reprodução (Holden-Dye et al., 2013; Pereira et al., 2015; Thapliyal & Babu, 2018). Esse sistema neural age através da ação do neurotransmissor acetilcolina (ACh), atuando nos receptores nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (mAChRs) modulando a atividade muscular e a função neuronal dos vermes (Kato et al., 2021; Park et al., 2003; Pereira et al., 2015; Sloan et al., 2015).

Nos músculos do nematoide *C. elegans* estão localizados os receptores nicotínicos e muscarínicos, que são específicos para acetilcolina. Os receptores nicotínicos são canais iônicos que respondem rapidamente a acetilcolina e desencadeia uma contração muscular direta. Por outro lado, os receptores muscarínicos são acoplados a proteína G e tem efeitos mais complexos sobre a função muscular, modulando processos intracelulares através de segundos mensageiros (Park et al., 2003; Sloan et al., 2015; Thapliyal & Babu, 2018).

Para o funcionamento do movimento em *C. elegans*, o sistema colinérgico desempenha um papel fundamental liberando acetilcolina através dos neurônios colinérgicos, o que irá ativar os receptores nicotínicos nas células musculares, permitindo a entrada de íons de sódio nos músculos, causando a despolarização. Essa ação irá controlar os movimentos de contração e relaxamento muscular coordenado, gerando através dessa comunicação neuromuscular os movimentos ondulados característicos do verme, permitindo a locomoção, busca por alimento e quando na natureza, a fuga de predadores (Deng et al., 2021; Estevez et al., 2012; Thapliyal & Babu, 2018).

O sistema colinérgico também tem um papel importante para o mecanismo de postura de ovos e reprodução em *C. elegans*. Os neurônios colinérgicos podem liberar acetilcolina para modular a contração muscular da vulva, uma estrutura anatômica da qual os ovos são expelidos durante a reprodução, permitindo a deposição ordenada de ovos. Além disso a acetilcolina pode influenciar na maturação sexual garantindo uma reprodução eficiente do verme (Estevez et al., 2012; Liu et al., 2007; Silva et al., 2023).

Genes como *lev-1* e *acr-23* são importantes para coordenar esses mecanismos. O gene *lev-1* codifica uma subunidade do receptor nAChR essencial para a função

motora e sensorial do nematoide, assim mutações nesse gene podem levar a defeitos na locomoção, postura de ovos e nas respostas a estímulos (Fleming et al., 1997; Neveu et al., 2010). Já o gene *acr-23* codifica uma proteína que regula a liberação de acetilcolina dos neurônios colinérgicos, e mutações nesse gene podem levar a defeitos na contração muscular, postura de ovos e também na reprodução (Peden et al., 2013; Rufener et al., 2013). Devido a todos esses processos o sistema colinérgico demonstra sua importância no nematoide *C. elegans* e genes como *lev-1* e *acr-23* demonstram papéis essenciais no sistema, modulando a sinalização colinérgica e garantindo o funcionamento do organismo do verme.

5. MATERIAIS, METODOS E RESULTADOS

A metodologia, resultados e discussão desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito científico.

NEMATICIDAL ACTIVITY OF α -THUJONE IN *Caenorhabditis elegans*

Matteus Teixeira Guerra¹, Júlia Souza Esteves¹, Natália Silva Jardim¹ and Daiana Silva Ávila^{1*}

¹Graduate Program in Biochemistry, Laboratory of Biochemistry and Toxicology in *Caenorhabditis elegans*, Federal University of Pampa, Urugaiana, RS, Zip code 97500-970, Brazil.

*Corresponding author:

Daiana Silva Ávila

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

BR 472 – Km 592 – Postal Code 118

Zip code 97500-970 Urugaiana /RS

Email: daianaavila@unipampa.edu.br

Abstract

Parasitic infections affect approximately 2 billion people globally, presenting clinical symptoms such as malnutrition, anemia, and diarrhea, while compromising the immune system and rendering individuals more susceptible to secondary infections. The resistance of parasites to current drugs necessitates the exploration of new therapeutics target, such as the promising α -thujone. It is found in plants like *Artemisia absinthium* and *Salvia officinalis*, exhibiting neurotoxic effects and emerging as a potential candidate for anti-helminthic treatment. However, developing new medications faces challenges, including accessing relevant stages of the parasite's life cycle. Therefore, utilizing *Caenorhabditis elegans* as an alternative model offers advantages in studying anti-helminthic effects, given its similarity to parasitic nematodes and conservation within the Nematoda phylum. In this study, we explore the anti-helminthic potential of α -thujone using the *C. elegans* model. Worms were exposed to chronic α -thujone treatment (0.5, 0.75, 1, and 1.5 mM), and 48 hours later, were subjected to analyses to assess nematicide potential. α -thujone was capable of reducing survival, egg production, and brood size in N2 strains at concentrations of 1.0 mM and 1.5 mM, as well as decreasing worm motility at a concentration of 1.5 mM. In strains resistant to commercial anti-helminthics, α -thujone exhibited varied effects: the ivermectin-resistant strain showed susceptibility to α -thujone effects, while levamisole and monepantel-resistant strains demonstrated some resistance, exhibiting only reduced nematode motility. Through our analyses, we observed nematicide potential in α -thujone, suggesting it could be an alternative for ivermectin-resistant strains, implying that α -thujone requires the cholinergic system to act.

Keywords: Anthelmintic, Parasites, *Artemisia absinthium*, *Salvia officinalis*, GABA

Introduction

Infections caused by parasites are among the most serious infectious processes in the world, affecting around 2 billion people across all continents (Andrade et al., 2017). These parasites can manifest clinically, such as malnutrition, anemia, irritability, and diarrhea. They also compromise the immune system, rendering individuals more susceptible to contracting other infections. Besides impacting humans, helminthiasis also affects animals and plants leading to significant economic losses in the agricultural sector. This impact includes reduced productivity, decreased fertility, delayed growth, and increased veterinary costs (Andrade et al., 2011; Curval et al., 2017). Phytoparasitic nematodes, for instance, can affect the root system of the plants, reducing agricultural crop productivity and serving as transmitters of other plant pathogens (Dilks et al., 2020; Tileubayeva et al., 2021). In underdeveloped countries like Brazil, factors such as climatic conditions, lack of public policies, and socioeconomic conditions hinder the maintenance and attention given to endemic foci of these nematodes. Furthermore, helminths exhibit amplified

transmission processes due to the resistance of their eggs to therapeutic agents, detergents, household disinfectants, and ultraviolet radiation. This resistance characteristic means that public environments with significant human circulation represent potential transmission sites for these parasites (Andrade et al., 2017; Scholte et al., 2015)

Despite the impacts caused by these parasites, there is a small repertoire of drugs available for the treatment of helminthiasis in the agricultural, veterinary and human's sectors. The excessive use of the same medications has led to resistance in these parasites, demanding additional research into new medications to combat this type of infection (L. M. Pallotto et al., 2022). Due to this resistance, new molecules have been studied, among which the derivatives of natural products stand out, such as *Picria fel-terrae*, (Kumarasingha et al., 2019) and *Pleurotus djamor* (Pineda-Alegria et al., 2017). Medicinal plants are widely used in traditional medicine around the world, with some emerging as alternatives for the treatment of helminthiasis and other parasitic diseases, such as *Artemisia absinthium* and *Salvia officinalis* (Băieș et al., 2022; Buza et al., 2020).

α -thujone, a saturated monoterpenic ketone, is present in several plants, being one of the major compounds in *Artemisia absinthium* and *Salvia officinalis*, and also an important component in herbal medicines (Creed et al., 2015; Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Williams et al., 2016). Its neurotoxic effect is widely known, although its risk to humans is minimal. In rodent's studies, its mechanism of action was discovered, in which it inhibits the gamma-aminobutyric acid A (GABAA) receptor, causing excitement, and convulsions in a dose-dependent manner. α -thujone acts as a fast-acting modulator of the GABA-regulated chloride channel, mainly affecting the opening and closing properties of this channel, as well as the inhibitory action of the postsynaptic frequency (Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013).

The development of new drugs faces difficulty in accessing the relevant stages of the parasites' life cycle, generating high costs and highly complex processes. To overcome some of these limitations, the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used. The *C. elegans* is a reliable model organism for studying scientific questions related to nematodes, as it shares many key features with parasitic nematodes, including the cuticle, nervous and neuromuscular systems and other physiological aspects (Dilks et al., 2020; L. Holden-Dye & R. Walker, 2014). *C. elegans* is an *in vivo* model that is used in screening assays for pharmacology and toxicology. This model has several advantages, such as low maintenance cost, rapid reproduction, and the possibility of monitoring their entire larval development. With its molecular parallels to parasitic nematodes, *C. elegans* provides a robust model for investigating anthelmintic effects on shared neuromuscular functions, including motility and neurotransmitter responses. A genetic overlap with the main parasites of the phylum generates more security for the use of the model; for example, *Ascaris suum* and *Haemonchus contortus* have around 67-69% of their genes similar to *C. elegans* (Burns et al., 2015; Hahnel et al., 2020; L. Holden-Dye & R. J. Walker, 2014; White et al., 2019)

Considering the increasing resistance to currently available drugs for the treatment of parasitic infections and the properties of α -thujone, the aim of this study was to investigate the potential nematicide effects using wildtype *C. elegans* and transgenic strains resistant to the main

drugs available in the market for parasitic infections, in order to identify a possible mechanism of α -thujone in *C. elegans*.

Material and Methods

Chemicals

α -thujone was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), monopotassium phosphate (KH₂PO₄), and disodium phosphate (Na₂HPO₄), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) were acquired from Labsynth (Diadema, SP, Brazil). All other chemical products were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Strains, Maintenance and Synchronization

The strains of *C. elegans* used in this study were N2 Bristol (wild type), MD701 *bcls39* [*lim-7p::ced-1::GFP + lin-15(+)*], transgenic strains resistant to anthelmintics which were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Twin Cities, MN, USA). Strains were maintained on nematode growth medium (NGM) plates and seeded with *Escherichia coli* - OP50 (*E. coli* OP50) at 20°C. Worms at the first (L1) larval stage used during exposures were obtained through a synchronization process. This process was performed using gravid adult worms exposed to a lysis solution (1M NaOH, 1% NaClO, and distilled H₂O) to break the worms' cuticle and release the eggs. After 14 hours of incubation at 20°C, the eggs hatched, releasing synchronized L1 larvae.

Strain	Resistance	Gene Mutation
DA1316	Ivermectin (IVM)	[<i>avr-14(ad1305)</i> I; <i>avr-15(vu227)</i> <i>glc-1(pk54)</i> V]
CB211	Levamisole (LVM)	[<i>lev-1(e211)</i> IV]
RB2119	Monepantel (MPT)	[<i>acr-23(ok2804)</i> V]

Table 1. Transgenic strains of *C. elegans* and their respective resistance to anthelmintic drugs

Exposure Protocol

Firstly, we conducted a concentration curve of α -Thujone in a chronic exposure. Approximately 1500 worms at the first larval stage were transferred to NGM plates seeded with *E. coli* OP50 until the designated day for experiments (48 hours, reaching the L4 stage). Then, the following concentrations were chosen to continue with the experiments: 0.5 mM, 0.75 mM, 1.0 mM, and 1.5 mM. In parallel, 1500 worms were treated for 30 minutes using with 2.0% DMSO (vehicle). At the end of treatment, the worms were centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes and

transferred to NGM plates seeded with *E. coli* OP50. The experimental protocol of this study was carried out using the following groups:

Control Group - Worms treated with vehicle (2.0% DMSO).

α -Thujone Groups - Worms treated with α -Thujone at 0.5 mM, 0.75 mM, 1.0 mM, and 1.5 mM concentrations.

The strains N2, DA1316, CB211, and RB2119 were used to perform survival assays, body size, brood size, egg production, and motility assays. The strain with the caspase CED-1 tagged with green fluorescent protein (GFP) MD701 was used for quantification of apoptotic corpses. All experiments were conducted in a controlled environment at 20°C.

Survival Assay

To assess the effects of chronic exposure to α -Thujone on the survival rate in *C. elegans*, approximately 1500 L1 stage worms were exposed to the compound and the number of live worms at the L4 stage (after 48h treatment) was determined. The population estimation involved quadrant-based counting within a delimited area using an Olympus SZ51 microscope. The live worms were compared to the control group to determine the survival rate from which the lethal concentration 50% (LC50) was calculated. The rate of live worms was expressed as a percentage of the control and at least four independent experiments were conducted in duplicate in this assay.

Body Size

In the body size assay, 48 hours (L4 stage) after treatment with α -Thujone worms were collected and transferred to microtubes. Subsequently, the worms underwent three washes using the M9 buffer to remove bacteria. These worms were then transferred to glass slides, paralyzed with levamisole (1 mM), and covered with coverslips for image acquisition using a Nikon Eclipse 50i microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) for Windows was used to measure both the length of the worm's body from head to tail and the body area. The body size (length and area) was expressed as a micrometer (μm) and compared to the control group. Each group was assessed with 10 worms and at least four independent experiments were conducted for these assays.

Egg Production

72 hours (first day of adulthood) after chronic exposure of 30 minutes with α -thujone 5 worms from each group were selected and exposed to a lysis solution (1M NaOH, 1% NaClO, and distilled H₂O) under a glass slide. After 5 minutes, worms' cuticle broke and the number of eggs was counted using an Olympus SZ51 stereomicroscope. The results were expressed by the total number of eggs present within the worms. At least four independent experiments were conducted for this assay.

Brood Size

To assess the reproductive capacity of *C. elegans* the brood size of the worms was monitored. 48 hours (L4 stage) after exposure to α -thujone, one worm from each group was transferred to plates containing NGM medium and *E. coli* OP50 (10 μ L) seeded in the center of the plate, creating a favorable environment for worm reproduction. Each worm was transferred to a new NGM plate every 24 hours until the end of the reproductive period. Using an Olympus SZ51 stereomicroscope, the size of the worm offspring was counted daily. The brood size was expressed as the total number of worms during the 3-day reproductive period of the worm. At least four independent experiments, each conducted in triplicate, were conducted for this assay.

Apoptosis in the Germline Cells

Transgenic worms MD701 expressing the pro-apoptotic caspase CED-1 tagged with GFP were subjected to the α -thujone treatment protocol. After 72 hours (first day of adulthood) of the treatments, worms were collected, transferred to microtubes, and washed three times with M9 buffer followed by natural sedimentation to remove bacteria. Subsequently, worms were placed on glass slides containing levamisole (1 mM) and covered with coverslips. Images were captured using the FLOID Cell Imaging Station fluorescent microscope (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 4471136, USA). The number of apoptotic germline cells was analyzed on both the gonads arms in 10 worms per group, per independent assay and the data were expressed in number of apoptotic corpses. At least five independent experiments were conducted for this assay.

Swimming assay

The swimming assay was performed based on the Liu et al. (2022) with modifications. At L4 stage (48h) worms were removed from NGM plates and transferred to microtubes where they underwent 3 washes using M9 buffer to remove excess of *E. coli* OP50. Finally, approximately 60 worms were added to each well in a 96-well plate and placed in the WMicrotracker apparatus (Phylumtech, Santa Fe, Argentina). The worms were analyzed for 120 minutes with 30-minute intervals and the results were expressed as mean movement unit. At least four independent experiments were conducted for this assay.

Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and subjected to the Shapiro-Wilk normality test (all $p > 0.05$). Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. The swimming assay were analyzed using repeated two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All experiments were performed in duplicate and four or five independent experiments. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 9 software. LC50 was reported as a logarithmic concentration curve for the percentage of dead worms.

Results

Effect of the exposure to α -thujone on the *C. elegans* survival

The Figure 1 demonstrates the α -thujone effects on the survival of different *C. elegans* strains. Statistical analysis showed that α -thujone caused a reduction in the survival rate of N2 (wild type) worms at the highest concentrations (1.0 mM and 1.5 mM) when compared to the control group (Figure 1A), and the LC₅₀ found was 1.23 mM.

This finding was also evidenced in DA1316 worms (Figure 1B), however, in CB211 (Figure 1C) and RB2119 (Figure 1D) strains no change was noted in the survival rate of the worms compared to the control group. The 0.5 mM and 0.75 mM concentrations were not able to reduce the worm survival rate at any of the strains tested.

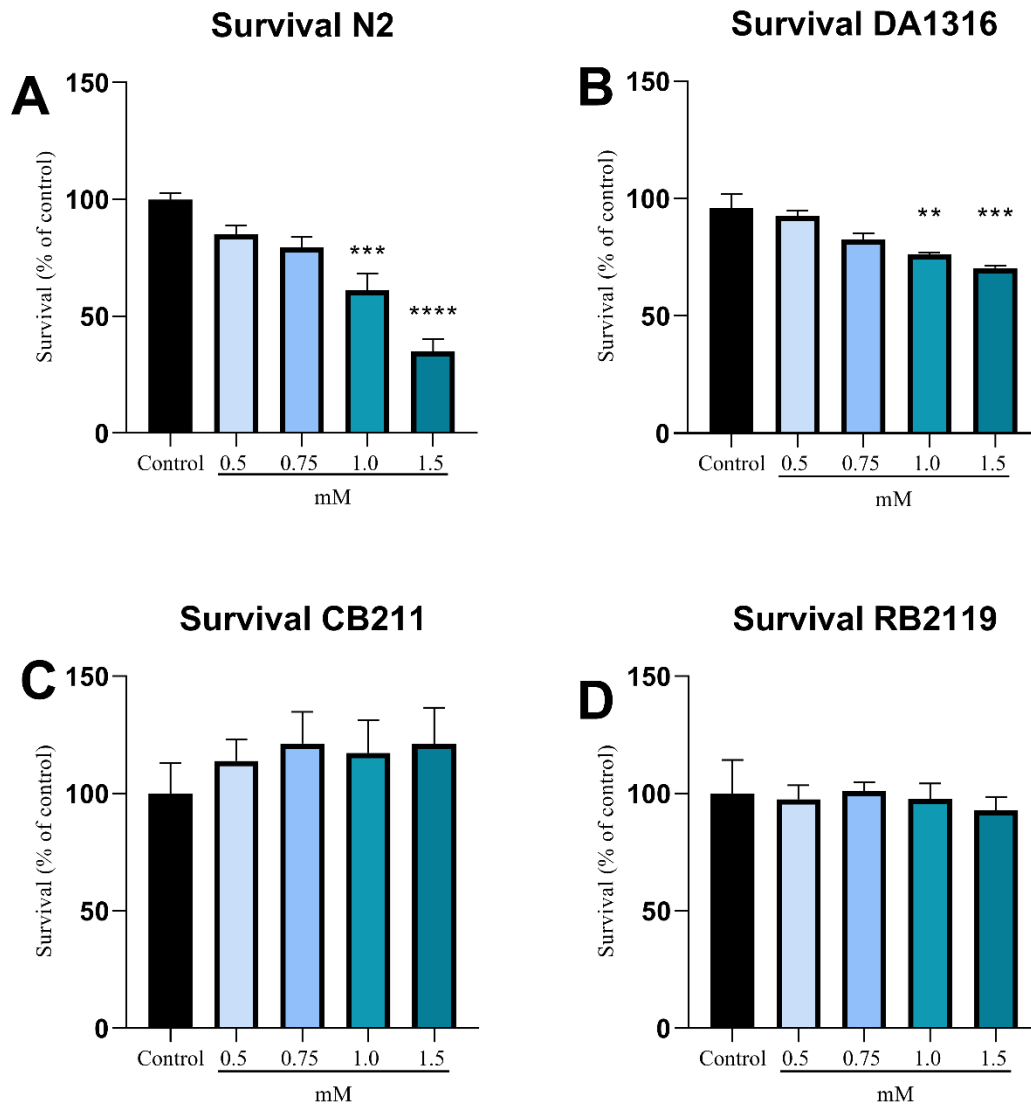


Figure 1. Effects of chronic α -thujone treatment on the survival rate of L4 stage worms (48 hours after treatment) in (A) N2, (B) DA1316 (IVM), (C) CB211 (LVM) and (D) RB2119 (MPT) strains. Values are expressed as mean \pm SEM and 4 independent experiments per group. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ denotes the significance levels compared to the control group.

α -thujone does not change the body size of the worms

Statistical analysis showed that the α -thujone treatment did not induce significant changes in the length and body area of the surviving worms (Figure 2). Data indicated that none of the concentrations tested (0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 mM) were able to decrease the body size (length and area) of N2 worms (Figures 2A and 2B) compared to the control group. This data was also observed when α -thujone treatment was carried out in the resistant strains DA1316 (Figures 2C and 2D), CB211 (Figures 2E and 2F), and RB2119 (Figures 2G and 2H).

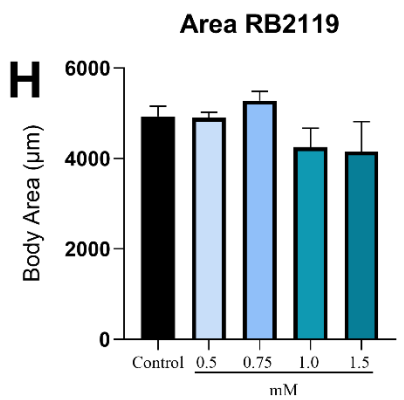
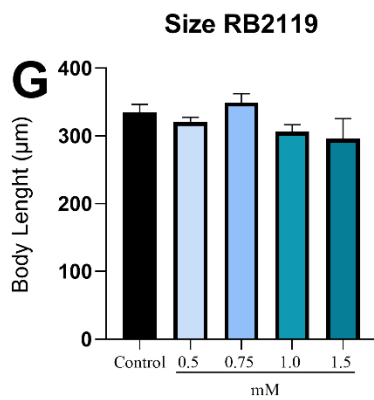
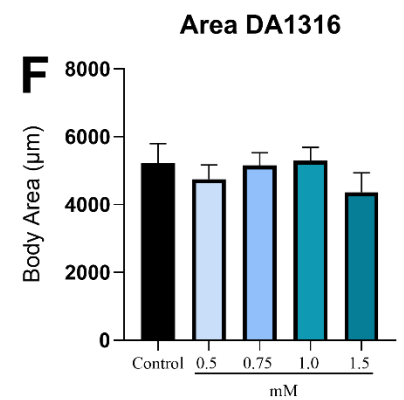
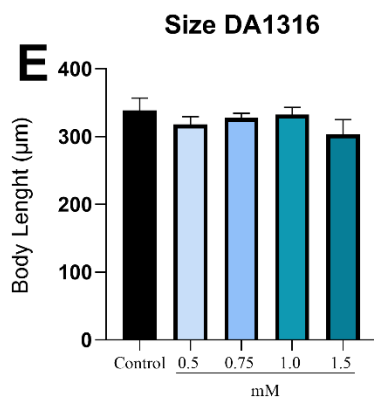
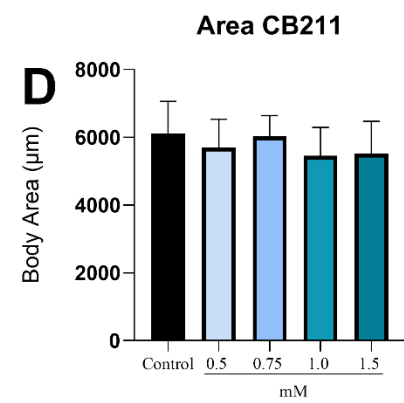
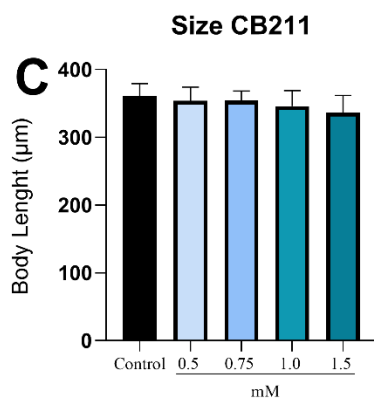
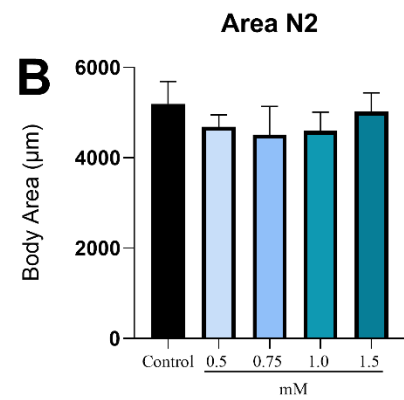
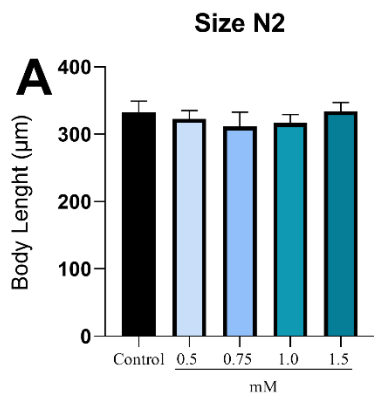


Figure 2. Effects of chronic treatment with α -thujone on the body size of L4 stage worms (48 hours after treatment) in (A) Body length and (B) area of N2 (C) Body length and (D) Body area of DA1316 (IVM) (E) Body length and (F) Body area of CB211 (LVM) (G) Body length and (H) Body area of RB2119 (MPT). Values are expressed as mean \pm SEM and 4 independent experiments per group.

The effect of the treatment with α -thujone on worm reproduction.

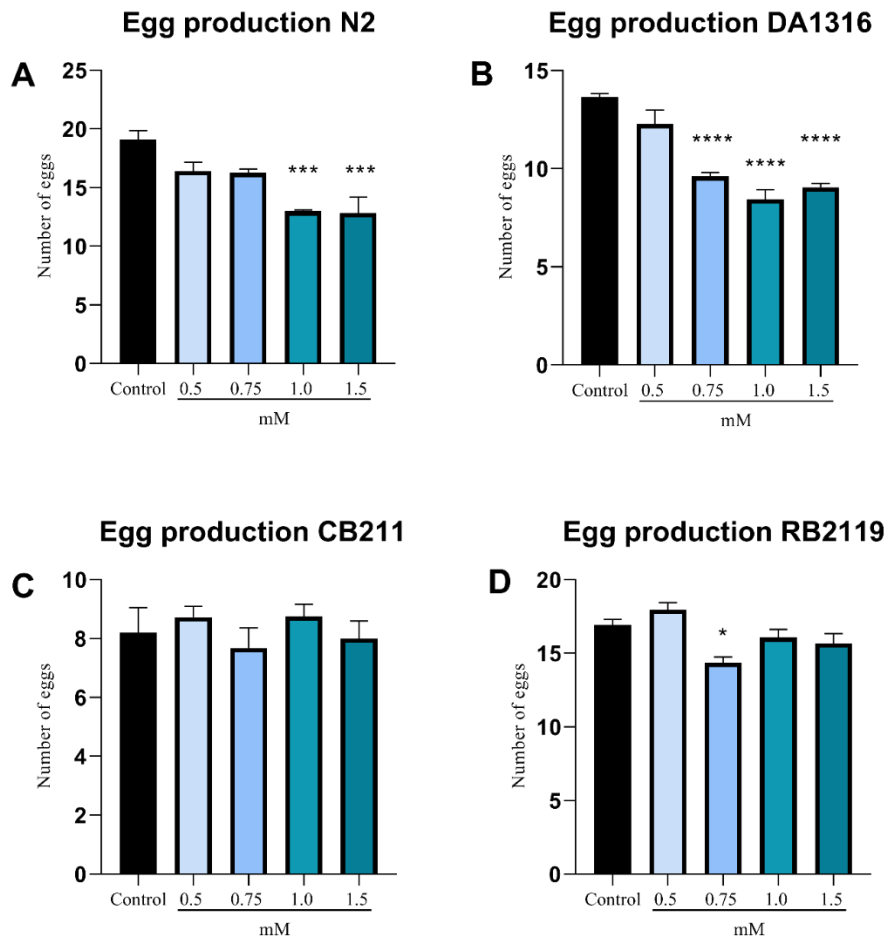


Figure 3. Effects of chronic treatment with α -thujone on (A) Egg production of N2, (B) Egg production of DA1316 (IVM), (C) Egg production of CB211 (LVM), (D) Egg production of RB2119 (MPT). Values are expressed as mean \pm SEM and 4 independent experiments per group. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc test. *p<0.05, ***p<0.001 and ****p<0.0001 denotes the significance levels compared to the control group.

Figures 3 and 4 represent the effects of α -thujone treatment on the worm's egg production and brood size, respectively, throughout the reproductive period. Initially, statistical analysis showed that α -thujone treatment at 1.0 mM and 1.5 mM concentrations significantly inhibit egg production in the N2 worms when compared to the control group (Figure 3A). Besides, statistical data demonstrated that α -thujone treatment at 0.75 mM, 1.0 mM and 1.5 mM concentrations inhibited egg production in the Ivermectin resistant strain when compared to the control group (Figure 3B) while in the Monepantel resistant strain (Figure 3D) was observed an egg production decrease only in the 0.75 mM concentration when compared to the control group. Statistical data revealed that egg production was not alter in the CB211 (LVM) worms after α -thujone treatment when compared to the control group (Figure 3C).

In addition, statistical data demonstrated that at 1.0 mM and 1.5 mM α -thujone treatment significantly decreased the brood size of worms in N2 strains when compared to the control group (Figure 4A). However, the α -thujone treatment did not show significant difference on the brood size in both DA1316 (LVM) and CB211 strains when compared to the respective control group (Figures 4B and 4C). It was not possible to obtain the brood size analysis of the RB2119 (MPT) strain due to its different reproductive period compared to the other tested strains.

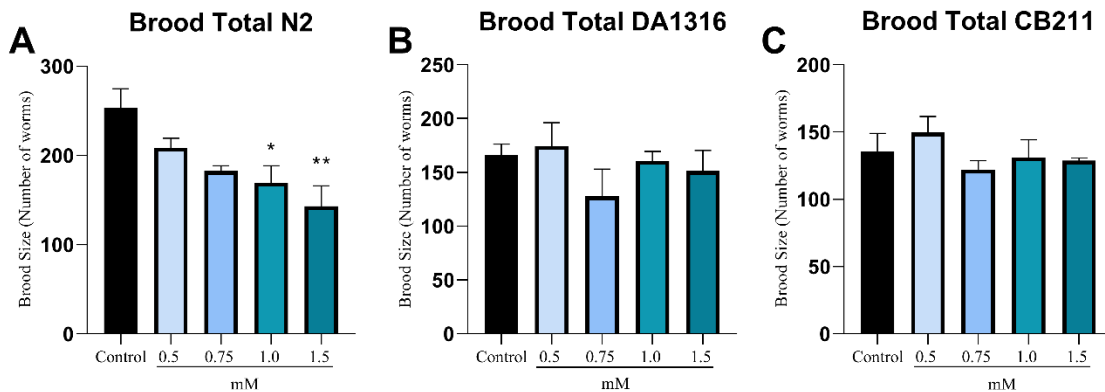


Figure 4. Effects of chronic α -thujone treatment on brood size of L4 stage worms (48 hours after treatment). (A) Brood size of N2, (B) Brood size of DA1316 (IVM), (C) Brood size of CB211 (LVM). Values are expressed as mean \pm SEM and 4 independent experiments per group. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc test. * $p > 0.05$ and ** $p > 0.01$ and denotes the significance levels compared to the control group.

Effect of chronic α -thujone treatment on germ cells of *C. elegans*.

One-way ANOVA analysis of the number of apoptotic corpses revealed a significant difference between the groups. Post hoc comparisons demonstrated an increase in the number of apoptotic bodies at 0.5 mM, 0.75 mM, and 1.0 mM concentrations in worms treated with α -thujone when compared to the control group (Figure 5A). Figure 5B depicts representative images of apoptotic corpses using strain MD701.

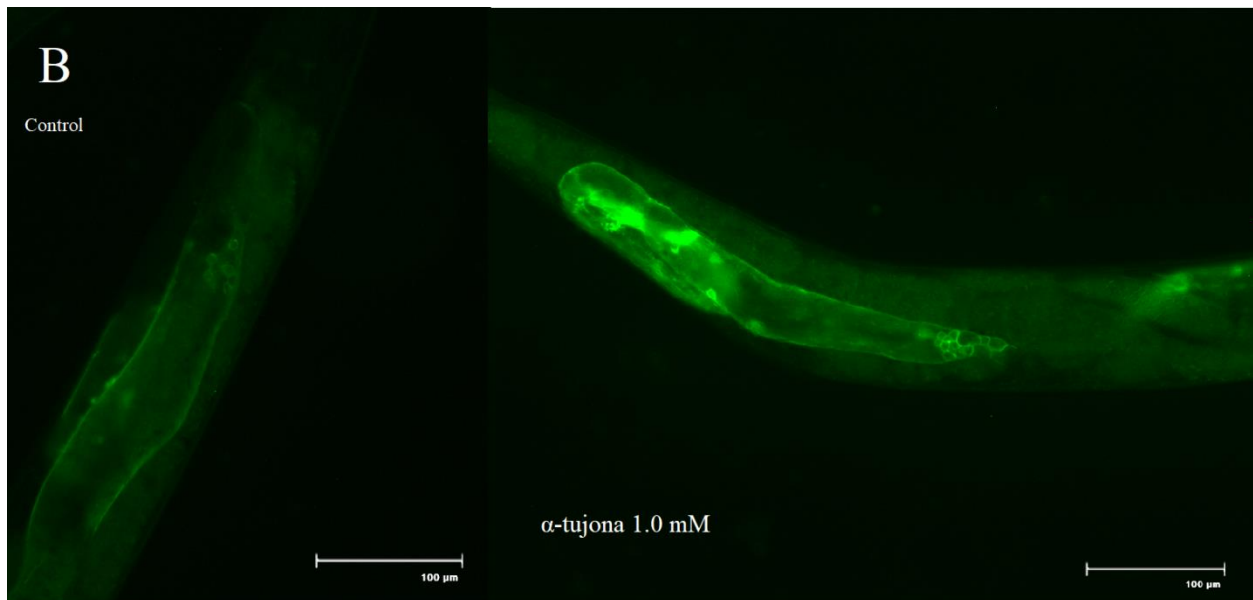
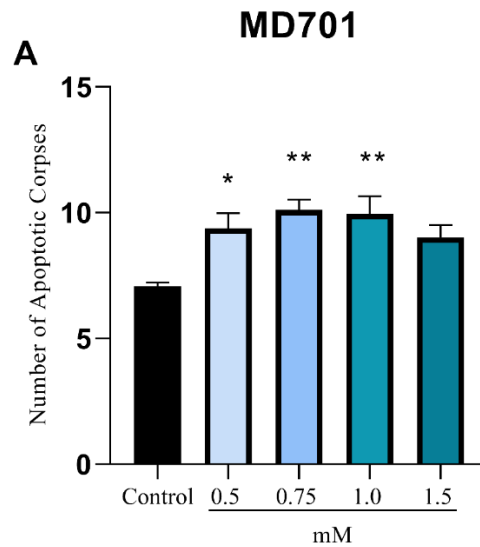


Figure 5. Effect of α -thujone on germline cells apoptosis in worms exposed to treatment, on their first day as adults (72 hours after treatment). (A) Number of apoptotic corpses (n=5) and (B) representative images of apoptotic cells from strain MD701. Values are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denotes the significance levels compared to the control group.

The effect of the treatment with α -thujone on worm motility.

Repeated two-way ANOVA analysis of the motility index revealed a significant difference in N2 worms at all analyzed time points when exposed to a concentration of 1.5 mM compared to

the control group (Figure 6A). DA1316 (Figure 6B) showed reduced motility when exposed to a concentration of 0.5 mM after 90 minutes of analysis compared to the control group, while concentrations of 0.75 mM decreased motility at 30, 60, and 90 minutes of analysis. CB211 (Figure 6C) exhibited reduced motility compared to the control group at concentrations of 0.5 mM at 30 minutes of analysis and 1.5 mM at 120 minutes of analysis. RB2119 (Figure 6D) showed decreased motility compared to the control only at the concentration of 1.0 mM at 90 and 120 minutes of analysis.

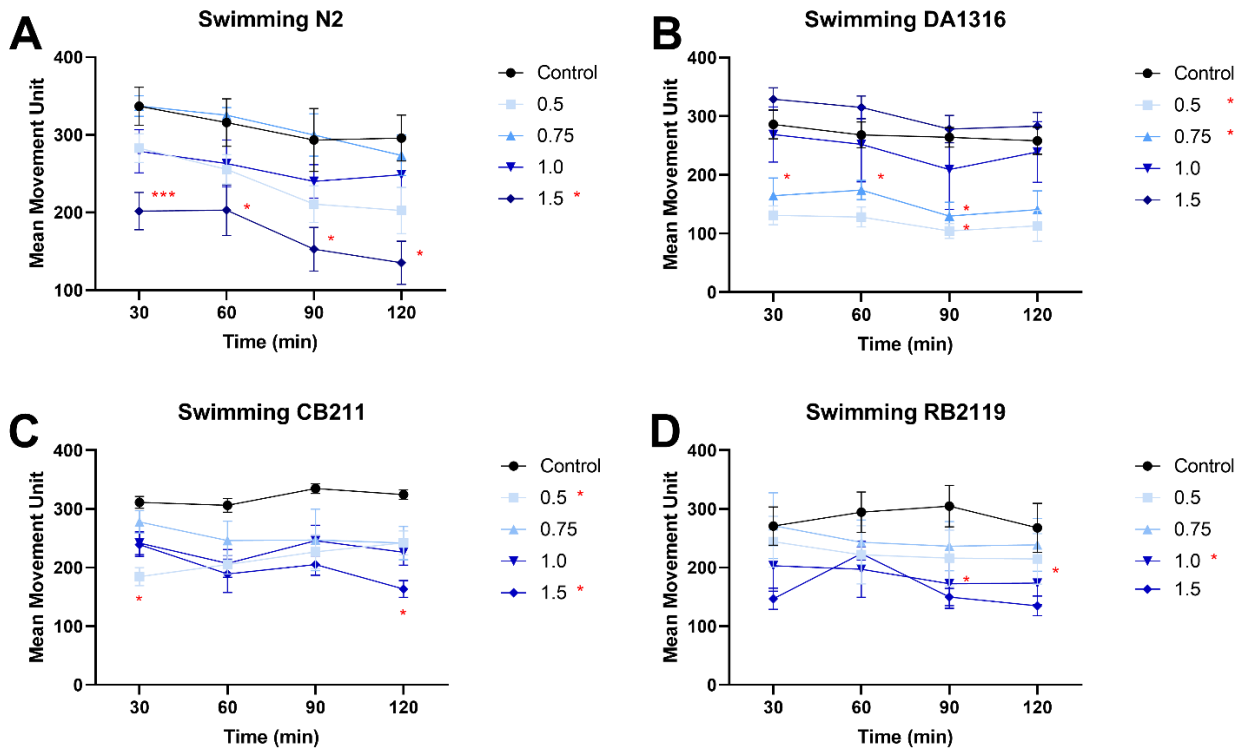


Figure 6. α -thujone effect on the locomotion of the worms exposed for 48 hours in (A) N2 motility index, (B) DA1316 (IVM) motility index, (C) CB211 (LVM) motility index, and (D) RB2119 (MPT) motility index. Values are expressed as mean \pm SEM and 4 independent experiments per group. Data were analyzed using the swimming assay analyzed using repeated two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 denotes the significance levels compared to the control group.

Discussion

Several studies have demonstrated the use of herbs in traditional medicine since antiquity. In ancient Egypt, *Artemisia absinthium* was frequently used for its potential antiparasitic properties, while in the Middle East, *Salvia officinalis* was commonly employed for the same purpose (Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Pelkonen et al., 2013; Sharifi-Rad et al., 2022). Over time, these herbs have been the focus of clinical research aimed at verifying their nematicide

activity. In addition to being used in traditional medicine for the same purpose, these herbs also share an important component, α -thujone.(Rasmussen & Rosenfjeld, 2020; Sharifi-Rad et al., 2022).

In this study, we investigated the effects of the chronic exposure of α -thujone and its toxicological effects in *C. elegans*. Due to its chemical nature, where its structure consists of a six-membered ring containing an oxygen atom, thujone is conferred with important lipophilic properties, allowing specific interactions with different receptors and enzymes in the organism, potentially generating significant biological effects (Lachenmeier, Emmert, et al., 2006; Lachenmeier, Walch, et al., 2006; Thamm et al., 2018). The toxicity of α -thujone has been a subject of great scientific interest, and its mechanism has been convincingly studied in rodents and neuronal cells, leading to an understanding of its rapid modulatory action on chloride channels controlled by GABA. This affects primarily the properties of channel opening and closing and the frequency of postsynaptic currents (Czyzewska & Mozrzymas, 2013; Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013). However, other studies have suggested, *in vitro*, that thujone can act through other targets as α 7-nicotinic acetylcholine receptors (Sultan et al., 2017), which may collaborate to its promising potential as anthelmintic drug.

We conducted an initial screening of the effects caused by α -thujone using the *C. elegans* wild-type strain (N2), where we assessed worm survival after chronic exposure to the compound. Firstly, we observed a significant decrease in worm survival at concentrations of 1.0 mM and 1.5 mM compared to the control group treated only with 2% DMSO. In N2, we found an LC₅₀ of 1.23 mM (187 μ g/ml), which is significantly higher compared to common medications such as Ivermectin (2.17 μ g/ml), Levamisole (4.12 μ g/ml), and Albendazole (4.26 μ g/ml) in *C. elegans* (Kalmobé et al., 2017). Based on previous studies with other models, it is known that α -thujone can interact with GABA receptors, which are ion channels linked to the principal inhibitory neurotransmitter in the nervous system, potentially leading to chloride ion channel opening in neuronal cells. We hypothesized that this action could hyperpolarize the cell membrane and suppress neuronal activity, acting as an antagonist of GABA receptors by interfering with GABA binding or altering receptor response to the neurotransmitter. These toxic effects could impair basic physiological actions in the worm, such as feeding, motility, and potentially lead to death (Czyzewska & Mozrzymas, 2013; Hold et al., 2000; Pelkonen et al., 2013; Rivera et al., 2014).

After evaluating the mortality potential of α -thujone in worms, we decided to assess how *C. elegans* behaves when exposed to chronic treatment with this compound in relation to body size and development. After exposure, we observed no interference in the body size or development of worms in the N2 strain. This result suggests that α -thujone has a mechanism of action that does not directly affect the cellular processes involved in the growth and development of *C. elegans*. Considering α -thujone as a potential nematicide compound, we proposed to analyze how this molecule would impact in the worm reproduction. We observed a decrease in both egg production and brood size in the N2 worms when exposed to concentrations of 1 mM and 1.5 mM. Through strain MD701, we were able to investigate other processes involved, such as an increase in apoptotic bodies in the germline cells of *C. elegans*, where all tested concentrations, except the

highest (1.5 mM), showed a significant increase. Knowing that α -thujone can interfere with receptors in the worm's nervous system and considering the simplicity of this system in *C. elegans*, we can speculate that α -thujone may affect communication between neurons and compromise essential functions for worm reproduction. As previously mentioned, α -thujone has known toxicity and at certain concentrations can cause cellular toxicity, which is a probable cause of the observed death of germline cells and compromised reproductive capacity of the worm (Barbagallo et al., 2017; Rathor et al., 2024).

Several studies involving the search for new nematicide molecules consider the assessment of worm motility behavior as a gold standard for these analyses (Buckingham et al., 2014; Liu et al., 2018; Risi et al., 2019; Vairoletti et al., 2021). We decided to follow our study by evaluating the motility of *C. elegans* during 120 minutes after chronic exposure to α -thujone at the L4 stage, using the Wmicrotracker equipment. Upon completing the analyses with the N2 strains, we noticed a decrease in worm movement over time at concentrations of 0.5 mM, 1.0 mM, and 1.5 mM compared to the control group. As previously mentioned during this study, it is known that α -thujone can act on both the GABAergic and cholinergic systems (Pelkonen et al., 2013; Sultan et al., 2017). When discussing motility in *C. elegans*, we can relate the decrease in movement to a combination of negative effects on the GABAergic system along with neuronal dysfunction in the cholinergic system, causing an imbalance between neuronal excitation and inhibition (Czyzewska & Mozrzymas, 2013; Hold et al., 2000; Sultan et al., 2017). These actions of α -thujone interacting with both systems together can affect various receptors and directly alter the worm's ability to move in a coordinated and efficient manner. This is an interesting mechanism considering that by reducing worm movement, reproduction, and survival, α -thujone demonstrates potential to treat infections caused by parasites (Czyzewska & Mozrzymas, 2013; Hold et al., 2000; Rivera et al., 2014).

After evaluating the effects of α -thujone in wild-type worms, we decided to assess how this compound would act against transgenic strains resistant to major commercially available nematicides. The DA1316 strain is resistant to Ivermectin due to knockout mutations in its *avr-14*, *avr-15*, and *glc-1* genes, which encode glutamate-gated chloride channels in *C. elegans* that confer strong resistance against Ivermectin (Dube et al., 2023; Ndjonka et al., 2014). Therefore, we expected the effect of α -thujone not to differ from what occurred with N2, as these are not known targets of α -thujone based on the literature. Following experiments, we noted that the survival data in Ivermectin-resistant worms replicated the findings in N2. When evaluating body size and larval development, we also did not obtain significant results similar to those in N2. These data indicate that indeed, thujone does not need the glutamatergic system to act as a nematicide.

We also tested worm reproduction in the Ivermectin-resistant DA1316 strain and noted a decrease in egg production at concentrations of 0.75 mM, 1.0 mM, and 1.5 mM compared to the control group. However, when evaluating the brood size of the worms, we did not observe a significant decrease compared to the control group. We suspect that mutations in the *avr-14* and *avr-15* genes, which encode ionotropic glutamate receptors, may lead to reduced glutamate levels available for conversion to GABA. This could enhance the effect of α -thujone in decreasing egg

production (Cooper & Jeitner, 2016; Ndjonka et al., 2014; Sarasa et al., 2020) Additionally, during the brood size experiment, we found that this transgenic strain exhibited different reproductive periods compared to the N2 strain. This difference in reproductive timing may complicate the comparison of results and potentially explain the observed outcomes. In the motility analysis there was a significant decrease compared to the control only at the lower concentrations: 0.5 mM and 0.75 mM. Interaction with glutamate receptors affected by this mutation may be contributing to the complexity of this response, as they can interact in a complex way with the GABAergic system. At lower concentrations of α -thujone, partial inhibition of GABA receptors may be sufficient to observe a decrease in motility, but at higher concentrations, compensation through other mechanisms such as glutamate ionotropic receptors is necessary, as seen in the motility analysis, but a normal response is observed in intermediate concentrations (Castro et al., 2020; Thapliyal & Babu, 2018).

When we tested CB211, we observed that these levamisole-resistant worms were also resistant to α -thujone, suggesting that this compound may act similarly to levamisole in *C. elegans*. We did not observe any statistically significant data in this strain when analyzing survival, size, development, or reproduction of these worms. Regarding motility analysis, we found varied results where there was a decrease in the first 30 minutes of analysis at 0.5 mM, and in the last 30 minutes of analysis, the concentration of 1.5 mM managed to decrease motility compared to the control group. CB211 has a mutation in the *lev-1* gene that encodes a subtype of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Studies have shown that thujone can allosterically inhibit the function of the $\alpha 7$ -nAChR nicotinic acetylcholine receptor (Sultan et al., 2017). In this sense, α -thujone may also be acting on the cholinergic system of *C. elegans*, and a mutation in the *lev-1* gene may lead to loss of neurons expressing this receptor, reducing sensitivity to α -thujone (Fleming et al., 1997; Sultan et al., 2017). Considering the mutation in the *lev-1* gene of this strain and the resistance shown during the experiments of this study, we can speculate that α -thujone may act directly on this mechanism when discussing actions on the reproductive system and motility regulation in the *C. elegans* nematode, altering the sensitivity and receptor affinity, and even leading to saturation due to its mutation, which would lead to an effect at high and low concentrations as seen in the motility analysis, but a normal response in intermediate concentrations (Fleming et al., 1997; Ndjonka et al., 2014).

Similar to the levamisole-resistant CB211 strain, RB2119, a strain resistant to the latest AADs nematicides, also demonstrated resistance to α -thujone at all concentrations when analyzing the survival of these worms. RB2119 has a mutation in the *acr-23* gene, which like *lev-1*, also acts as an acetylcholine receptor allowing excitatory ion channel activity and is directly involved in membrane potential regulation (Rufener et al., 2013). Understanding the potential mechanism of α -thujone in the cholinergic system, which can interact in various ways in this system like inhibiting or modulating nicotinic receptors, could lead to desensitization of nAChRs (Sultan et al., 2017). This strain resistant to Monepantel, like the others tested, also did not show significant results regarding body size and larval development. Regarding reproduction, RB2119 demonstrated a decrease in egg production at 0.75 mM compared to the control group, but it was

not possible to evaluate the brood size of these worms because they exhibited a completely different reproductive period from N2 and other mutant strains, making comparison of the three-day reproductive period impossible. When evaluating the motility of this strain, we also noticed a significant decrease compared to the control at the concentration of 1.0 mM. Upon concluding the motility analyses of all strains, we noticed that movement was affected in all analyses at different concentrations, which leads us to suppose that this effect may be related to the mechanism of α -thujone in the GABAergic system, since none of the strains tested have a mutation in this system, but in combination with other mechanisms such as glutamate and acetylcholine receptors.

Conclusion

Following a detailed analysis of the effects of chronic exposure to α -thujone in *C. elegans*, this study highlights its toxicity and varied impact on transgenic strains resistant to major commercially available nematicides. Exposure to α -thujone, known for its neurotoxic action by modulating GABA receptors and possibly cholinergic receptors, resulted in decreased survival, compromised motility, and altered reproduction of the worms. Strains resistant to conventional nematicides showed diverse responses, suggesting more complex molecular targets and unknown resistance pathways to α -thujone. Although α -thujone did not interfere with worm development, reproduction and motility were significantly affected, confirming its potential use as an alternative nematicide compound. These findings provide valuable information for future studies in the quest for new nematicide molecules and illustrate the complex effects of α -thujone in *C. elegans*.

Data Availability Statement

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrade, E. C. d., Leite, I. C. G., Vieira, M. d. T., Abramo, C., Tibiriçá, S. H. C., & Silva, P. L. (2011). Prevalência de parasitoses intestinais em comunidade quilombola no Município de Bias Fortes, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2008. *Epidemiologia e serviços de Saúde*, 20(3), 337-344.
- Andrade, S. S., Teodoro, L. M., Viana, D. J., Canuto-Sales, E. M., Bahia-de-Oliveira, G. H., Villas Boas, S., & Barata, R. A. (2017). Intestinal parasites in public transport buses from the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil. *Res Rep Trop Med*, 8, 59-63. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S122046>
- Băieș, M.-H., Gherman, C., Boros, Z., Olah, D., Vlase, A.-M., Cozma-Petruț, A., Györke, A., Miere, D., Vlase, L., & Crișan, G. (2022). The effects of *Allium sativum* L., *Artemisia*

- absinthium L., Cucurbita pepo L., Coriandrum sativum L., Satureja hortensis L. and Calendula officinalis L. on the embryogenesis of Ascaris suum eggs during an in vitro experimental study. *Pathogens*, 11(9), 1065.
- Barbagallo, B., Philbrook, A., Touroutine, D., Banerjee, N., Oliver, D., Lambert, C. M., & Francis, M. M. (2017, May 15). Excitatory neurons sculpt GABAergic neuronal connectivity in the *C. elegans* motor circuit. *Development*, 144(10), 1807-1819.
<https://doi.org/10.1242/dev.141911>
- Buckingham, S. D., Partridge, F. A., & Sattelle, D. B. (2014, Dec). Automated, high-throughput, motility analysis in *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes: Applications in the search for new anthelmintics. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 4(3), 226-232.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.10.004>
- Burns, A. R., Luciani, G. M., Musso, G., Bagg, R., Yeo, M., Zhang, Y., Rajendran, L., Glavin, J., Hunter, R., & Redman, E. (2015). *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature Communications*, 6(1), 7485.
- Buza, V., Cătană, L., Andrei, S., Ștefănuț, L., Răileanu, Ș., Matei, M., Vlasiuc, I., & Cernea, M. (2020). In vitro anthelmintic activity assessment of six medicinal plant aqueous extracts against donkey strongyles. *Journal of helminthology*, 94, e147.
- Castro, M. J., Turani, O., Faraoni, M. B., Gerbino, D., & Bouzat, C. (2020). A New Antagonist of *Caenorhabditis elegans* Glutamate-Activated Chloride Channels With Anthelmintic Activity. *Front Neurosci*, 14, 879. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00879>
- Cooper, A. J., & Jeitner, T. M. (2016, Mar 26). Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/biom6020016>
- Creed, C., Mollhagen, A., Mollhagen, N., & Pszczolkowski, M. A. (2015). *Artemisia arborescens* "Powis Castle" extracts and alpha-thujone prevent fruit infestation by codling moth neonates. *Pharm Biol*, 53(10), 1458-1464.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2014.985796>
- Curval, L. G., Franca, A. d. O., Fernandes, H. J., Mendes, R. P., de Carvalho, L. R., Higa, M. G., Ferreira, E. d. C., & Dorval, M. E. C. (2017). Prevalence of intestinal parasites among inmates in Midwest Brazil. *Plos one*, 12(9), e0182248.
- Czyzewska, M. M., & Mozrzyk, J. W. (2013). Monoterpene α -thujone exerts a differential inhibitory action on GABA_A receptors implicated in phasic and tonic GABAergic inhibition. *European journal of pharmacology*, 702(1-3), 38-43.
- Dilks, C. M., Hahnel, S. R., Sheng, Q., Long, L., McGrath, P. T., & Andersen, E. C. (2020). Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta-tubulin alleles. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 28-36.
- Dube, F., Hinas, A., Delhomme, N., Åbrink, M., Svärd, S., & Tydén, E. (2023). Transcriptomics of ivermectin response in *Caenorhabditis elegans*: Integrating abamectin quantitative

trait loci and comparison to the Ivermectin-exposed DA1316 strain. *Plos one*, *18*(5), e0285262.

- Fleming, J. T., Squire, M. D., Barnes, T. M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., Fire, A., Sulston, J. E., Barnard, E. A., Sattelle, D. B., & Lewis, J. A. (1997, Aug 1). *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci*, *17*(15), 5843-5857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05843.1997>
- Hahnel, S. R., Dilks, C. M., Heisler, I., Andersen, E. C., & Kulke, D. (2020). *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research—Old model, new perspectives. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *14*, 237-248.
- Hold, K. M., Sirisoma, N. S., Ikeda, T., Narahashi, T., & Casida, J. E. (2000, Apr 11). Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(8), 3826-3831. <https://doi.org/10.1073/pnas.070042397>
- Holden-Dye, L., & Walker, R. (2014). Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1-29.
- Holden-Dye, L., & Walker, R. J. (2014, Dec 16). Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-29. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.2>
- Kalmobé, J., Ndjonka, D., Boursou, D., Vildina, J. D., & Liebau, E. (2017). Phytochemical analysis and in vitro anthelmintic activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the bovine parasite *Onchocerca ochengi* and on drug resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*, 1-12.
- Kumarasingha, R., Young, N. D., Yeo, T. C., Lim, D. S. L., Tu, C. L., Palombo, E. A., Shaw, J. M., Gasser, R. B., & Boag, P. R. (2019, Apr 25). Transcriptional alterations in *Caenorhabditis elegans* following exposure to an anthelmintic fraction of the plant *Picria fel-terrae* Lour. *Parasit Vectors*, *12*(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3429-4>
- Lachenmeier, D. W., Emmert, J., Kuballa, T., & Sartor, G. (2006, Apr 20). Thujone--cause of absinthism? *Forensic Sci Int*, *158*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.010>
- Lachenmeier, D. W., Walch, S. G., Padosch, S. A., & Kroner, L. U. (2006). Absinthe--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *46*(5), 365-377. <https://doi.org/10.1080/10408690590957322>
- Liu, M., Kipanga, P., Mai, A. H., Dhondt, I., Braeckman, B. P., De Borggraeve, W., & Luyten, W. (2018, Sep). Bioassay-guided isolation of three anthelmintic compounds from *Warburgia ugandensis* Sprague subspecies *ugandensis*, and the mechanism of action of polygodial. *Int J Parasitol*, *48*(11), 833-844. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.009>
- Liu, M., Lu, J.-G., Yang, M.-R., Jiang, Z.-H., Wan, X., & Luyten, W. (2022). Bioassay-guided isolation of anthelmintic components from *Semen pharbitidis*, and the mechanism of action of pharbitin. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 15739.

- Ndjonka, D., Abladam, E., Djafsia, B., Ajonina-Ekoti, I., Achukwi, M., & Liebau, E. (2014). Anthelmintic activity of phenolic acids from the axlewood tree *Anogeissus leiocarpus* on the filarial nematode *Onchocerca ochengi* and drug-resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of helminthology*, *88*(4), 481-488.
- Ozben, M., von Samson-Himmelstjerna, G., Freiin von Streit, M. K. B., Wilkes, E. J. A., Hughes, K. J., & Krucken, J. (2022, Apr 20). Absence of Polymorphisms in Codons 167, 198 and 200 of All Seven beta-Tubulin Isoforms of Benzimidazole Susceptible and Resistant *Parascaris* spp. Specimens from Australia. *Pathogens*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens11050490>
- Pallotto, L. M., Dilks, C. M., Park, Y. J., Smit, R. B., Lu, B. T., Gopalakrishnan, C., Gilleard, J. S., Andersen, E. C., & Mains, P. E. (2022, Jul 30). Interactions of *Caenorhabditis elegans* beta-tubulins with the microtubule inhibitor and anthelmintic drug albendazole. *Genetics*, *221*(4). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac093>
- Pelkonen, O., Abass, K., & Wiesner, J. (2013, Feb). Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: toxicological assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*, *65*(1), 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.002>
- Pineda-Alegria, J. A., Sanchez-Vazquez, J. E., Gonzalez-Cortazar, M., Zamilpa, A., Lopez-Arellano, M. E., Cuevas-Padilla, E. J., Mendoza-de-Gives, P., & Aguilar-Marcelino, L. (2017, Dec). The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *J Med Food*, *20*(12), 1184-1192. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0031>
- Rasmussen, L. H., & Rosenfeld, M. (2020, Jul 15). A rapid GC-FID method for determination of sabinene, beta-pinene, alpha-thujone and beta-thujone in the essential oil of Kitchen Sage (*Salvia officinalis* L.). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, *1149*, 122159. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122159>
- Rathor, L., Curry, S., Park, Y., McElroy, T., Robles, B., Sheng, Y., Chen, W. W., Min, K., Xiao, R., Lee, M. H., & Han, S. M. (2024, Mar 25). Mitochondrial stress in GABAergic neurons non-cell autonomously regulates organismal health and aging. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.20.585932>
- Risi, G., Aguilera, E., Lados, E., Suarez, G., Carrera, I., Alvarez, G., & Salinas, G. (2019, Mar 17). *Caenorhabditis elegans* Infrared-Based Motility Assay Identified New Hits for Nematicide Drug Development. *Vet Sci*, *6*(1). <https://doi.org/10.3390/vetsci6010029>
- Rivera, E., Cid, M. P., Zunino, P., Baiardi, G., & Salvatierra, N. A. (2014). Central α - and β -thujone: Similar anxiogenic-like effects and differential modulation on GABA_A receptors in neonatal chicks. *Brain research*, *1555*, 28-35.
- Rufener, L., Bedoni, N., Baur, R., Rey, S., Glauser, D. A., Bouvier, J., Beech, R., Sigel, E., & Puoti, A. (2013). acr-23 Encodes a monepantel-sensitive channel in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog*, *9*(8), e1003524. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003524>
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F., & Angayarkanni, J. (2020, Apr). A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-

- amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Curr Microbiol*, 77(4), 534-544. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01839-w>
- Scholte, R. G. C., dos Santos Carvalho, O., de Lima, G. M. N., Araujo, A. D., & Massara, C. L. (2015). Pesquisa de ovos de helmintos intestinais nos terminais aeroportuários Carlos Drummond de Andrade (Pampulha)-Belo Horizonte e Tancredo Neves–Confins–Minas Gerais. *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, 44(3), 303-311.
- Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Semwal, P., Painuli, S., Badoni, H., Ezzat, S. M., Farid, M. M., Merghany, R. M., Aborehab, N. M., & Salem, M. A. (2022). Artemisia spp.: an update on its chemical composition, pharmacological and toxicological profiles. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 5628601.
- Sultan, A., Yang, K. S., Isaev, D., Nebrisi, E. E., Syed, N., Khan, N., Howarth, C. F., Sadek, B., & Oz, M. (2017, Jun 1). Thujone inhibits the function of alpha(7)-nicotinic acetylcholine receptors and impairs nicotine-induced memory enhancement in one-trial passive avoidance paradigm. *Toxicology*, 384, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.04.005>
- Thamm, I., Tiefenbacher, K., & Rychlik, M. (2018, Dec 3). Quantification of alpha-Thujone and Its Metabolites in Human Urine after Consumption of a Sage Infusion Using Stable Isotope Dilution Assays. *Toxins (Basel)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/toxins10120511>
- Thapliyal, S., & Babu, K. (2018). C. elegans Locomotion: Finding Balance in Imbalance. *Adv Exp Med Biol*, 1112, 185-196. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0_14
- Tileubayeva, Z., Avdeenko, A., Avdeenko, S., Stroiteleva, N., & Kondrashev, S. (2021). Plant-parasitic nematodes affecting vegetable crops in greenhouses. *Saudi journal of biological sciences*, 28(9), 5428-5433.
- Vairoletti, F., Baron, A., Saiz, C., Mahler, G., & Salinas, G. (2021). Increased sensitivity of an infrared motility assay for nematicide discovery. *MicroPubl Biol*, 2021. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000500>
- White, P. S., Penley, M. J., Tierney, A. R. P., Soper, D. M., & Morran, L. T. (2019). Dauer life stage of *Caenorhabditis elegans* induces elevated levels of defense against the parasite *Serratia marcescens*. *Scientific Reports*, 9(1), 11575.
- Williams, J. D., Yazarians, J. A., Almeyda, C. C., Anderson, K. A., & Boyce, G. R. (2016, Jun 1). Detection of the Previously Unobserved Stereoisomers of Thujone in the Essential Oil and Consumable Products of Sage (*Salvia officinalis* L.) Using Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*, 64(21), 4319-4326. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01065>
- Zámboriné Németh, É., & Thi Nguyen, H. (2020). Thujone, a widely debated volatile compound: What do we know about it? *Phytochemistry reviews*, 19, 405-423.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A α -tujona mostrou-se promissora como um potencial nematicida alternativo, atuando por mecanismos que incluem a modulação dos receptores GABAérgicos e, possivelmente, dos receptores colinérgicos. Essa ação complexa pode explicar as respostas variadas observadas em linhagens transgênicas de *C. elegans*, resistentes a nematicidas convencionais. A mutação em genes como *avr-14*, *avr-15*, *glc-1* (em DA1316), *lev-1* (em CB211) e *acr-23* (RB2119) influencia a resposta desses vermes à α -tujona, revelando possíveis vias de resistência ainda não completamente compreendidas.

Além de afetar a sobrevivência e a motilidade dos vermes, a α -tujona comprometeu significativamente a reprodução dos vermes em cepas N2, evidenciando sua capacidade de interferir em processos fundamentais de sobrevivência. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que indicam a toxicidade da α -tujona em diversos modelos, incluindo mamíferos e células neuronais, onde sua ação nos canais de cloro mediados pelo GABA desempenha um papel crucial.

Embora não tenha impactado diretamente o desenvolvimento dos vermes, a α -tujona se mostrou capaz de afetar negativamente a reprodução, um aspecto crítico para nematoides parasitos. A compreensão dos mecanismos de ação da α -tujona em *C. elegans* abre caminho para novas pesquisas visando explorar seu potencial como uma alternativa viável aos nematicidas existentes, especialmente diante da crescente necessidade de soluções eficazes contra parasitos resistentes.

7. PERSPECTIVAS

Utilizando os dados obtidos neste estudo, planejamos aprofundar as análises através de técnicas de biologia molecular para elucidar os mecanismos específicos pelos quais a α -tujona exerce seus efeitos nematicidas em *C. elegans*. Além disso, devemos realizar a avaliação da segurança do composto em modelos de roedores e testar sua eficácia em modelos de nematoides parasitos, visando ampliar o espectro de aplicação desse composto e comprovar sua ação nematicida.

Para complementar os resultados obtidos em *C. elegans*, pretendemos utilizar cepas knockout em genes específicos do sistema GABAérgico, a fim de elucidar o mecanismo de ação da α -tujona no nematoide. Também planejamos concluir as análises de tamanho de ninhada em cepas mutantes, acompanhando todo o período reprodutivo dessas cepas.

Além disso, iremos adicionar uma análise em uma cepa resistente aos benzimidazóis, importantes nematocidas disponíveis no mercado, utilizando *C. elegans*. Isso nos permitirá ampliar o entendimento sobre a eficácia da α -tujona em comparação com outros agentes terapêuticos existentes.

Os resultados deste estudo serão submetidos para publicação em revistas científicas especializadas em parasitologia e farmacologia, preparando pelo menos um artigo que detalha os efeitos da α -tujona em diferentes cepas de *C. elegans* e destacando sua relevância no desenvolvimento de novos agentes nematocidas.

Além da publicação, pretendemos compartilhar os achados com a comunidade acadêmica em eventos científicos, promovendo discussões e ampliando o conhecimento sobre compostos naturais com potencial terapêutico.

8. REFERENCIAS

- Abongwa, M., Marjanovic, D. S., Tipton, J. G., Zheng, F., Martin, R. J., Trailovic, S. M., & Robertson, A. P. (2018, Apr). Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8(1), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.12.001>
- Andrade, E. C. d., Leite, I. C. G., Vieira, M. d. T., Abramo, C., Tibiriçá, S. H. C., & Silva, P. L. (2011). Prevalência de parasitoses intestinais em comunidade quilombola no Município de Bias Fortes, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2008. *Epidemiologia e serviços de Saúde*, 20(3), 337-344.
- Andrade, S. S., Teodoro, L. M., Viana, D. J., Canuto-Sales, E. M., Bahia-de-Oliveira, G. H., Villas Boas, S., & Barata, R. A. (2017). Intestinal parasites in public transport buses from the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil. *Res Rep Trop Med*, 8, 59-63. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S122046>
- Arceusz, A., Occhipinti, A., Capuzzo, A., & Maffei, M. E. (2013). Comparison of different extraction methods for the determination of α - and β -thujone in sage (*Salvia officinalis* L.) herbal tea. *Journal of separation science*, 36(18), 3130-3134.
- Bagnall, N. H., Ruffell, A., Raza, A., Elliott, T. P., Lamb, J., Hunt, P. W., & Kotze, A. C. (2017, Aug). Mutations in the *Hco-mptl-1* gene in a field-derived monepantel-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 7(2), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.05.001>
- Băieș, M.-H., Gherman, C., Boros, Z., Olah, D., Vlase, A.-M., Cozma-Petruț, A., Györke, A., Miere, D., Vlase, L., & Crișan, G. (2022). The effects of *Allium sativum* L., *Artemisia absinthium* L., *Cucurbita pepo* L., *Coriandrum sativum* L., *Satureja hortensis* L. and *Calendula officinalis* L. on the embryogenesis of *Ascaris suum* eggs during an in vitro experimental study. *Pathogens*, 11(9), 1065.
- Baltrušis, P., Charvet, C. L., Halvarsson, P., Mikko, S., & Höglund, J. (2021). Using droplet digital PCR for the detection of *hco-acr-8b* levamisole resistance marker in *H. contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 15, 168-176.
- Bamber, B. A., Beg, A. A., Twyman, R. E., & Jorgensen, E. M. (1999, Jul 1). The *Caenorhabditis elegans unc-49* locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J Neurosci*, 19(13), 5348-5359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-13-05348.1999>
- Bamber, B. A., Twyman, R. E., & Jorgensen, E. M. (2003, Mar). Pharmacological characterization of the homomeric and heteromeric UNC-49 GABA receptors in *C. elegans*. *Br J Pharmacol*, 138(5), 883-893. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705119>
- Barbagallo, B., Philbrook, A., Touroutine, D., Banerjee, N., Oliver, D., Lambert, C. M., & Francis, M. M. (2017, May 15). Excitatory neurons sculpt GABAergic neuronal connectivity in the *C. elegans* motor circuit. *Development*, 144(10), 1807-1819. <https://doi.org/10.1242/dev.141911>

- Basanez, M. G., Pion, S. D., Boakes, E., Filipe, J. A., Churcher, T. S., & Boussinesq, M. (2008, May). Effect of single-dose ivermectin on *Onchocerca volvulus*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 8(5), 310-322. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70099-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70099-9)
- Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2003, Nov). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat Neurosci*, 6(11), 1145-1152. <https://doi.org/10.1038/nn1136>
- Beshay, E. (2018). Therapeutic efficacy of *Artemisia absinthium* against *Hymenolepis nana*: in vitro and in vivo studies in comparison with the anthelmintic praziquantel. *Journal of helminthology*, 92(3), 298-308.
- Brenner, S. (1974, May). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Buckingham, S. D., Partridge, F. A., & Sattelle, D. B. (2014, Dec). Automated, high-throughput, motility analysis in *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes: Applications in the search for new anthelmintics. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 4(3), 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.10.004>
- Burns, A. R., Luciani, G. M., Musso, G., Bagg, R., Yeo, M., Zhang, Y., Rajendran, L., Glavin, J., Hunter, R., & Redman, E. (2015). *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature Communications*, 6(1), 7485.
- Buza, V., Cătană, L., Andrei, S., Ștefănuț, L., Răileanu, Ș., Matei, M., Vlasiuc, I., & Cernea, M. (2020). In vitro anthelmintic activity assessment of six medicinal plant aqueous extracts against donkey strongyles. *Journal of helminthology*, 94, e147.
- Caner, A., Döşkaya, M., Değirmenci, A., Can, H., Baykan, Ş., Üner, A., Başdemir, G., Zeybek, U., & Gürüz, Y. (2008). Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis (*Trichinella spiralis*) in rats. *Experimental parasitology*, 119(1), 173-179.
- Canton, C., Canton, L., Lifschitz, A., Paula Dominguez, M., Alvarez, L., Ceballos, L., Mate, L., Lanusse, C., & Ballent, M. (2023, Jul). Monepantel-based anthelmintic combinations to optimize parasite control in cattle. *Int J Parasitol*, 53(8), 441-449. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2023.02.001>
- Castro, L. M., Pinto, N. B., Moura, M. Q., Villela, M. M., Capella, G. A., Freitag, R. A., & Berne, M. E. A. (2021, Jan-Feb). Antihelminthic action of the *Anethum graveolens* essential oil on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Braz J Biol*, 81(1), 183-188. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.225856>
- Castro, M. J., Turani, O., Faraoni, M. B., Gerbino, D., & Bouzat, C. (2020). A New Antagonist of *Caenorhabditis elegans* Glutamate-Activated Chloride Channels With Anthelmintic Activity. *Front Neurosci*, 14, 879. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00879>
- Chai, J. Y., Jung, B. K., & Hong, S. J. (2021, Jun). Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. *Korean J Parasitol*, 59(3), 189-225. <https://doi.org/10.3347/kjp.2021.59.3.189>

- Chapuis, Y. (2013, Feb). [Absinthe rehabilitated]. *Bull Acad Natl Med*, 197(2), 515-521. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24919378> (L'absinthe rehabilitee.)
- Cooper, A. J., & Jeitner, T. M. (2016, Mar 26). Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/biom6020016>
- Correa, E., Mialon, M., Cizeron, M., Bessereau, J. L., Pinan-Lucarre, B., & Kratsios, P. (2024, Feb 14). UNC-30/PITX coordinates neurotransmitter identity with postsynaptic GABA receptor clustering. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.02.14.580278>
- Creed, C., Mollhagen, A., Mollhagen, N., & Pszczolkowski, M. A. (2015). Artemisia arborescens "Powis Castle" extracts and alpha-thujone prevent fruit infestation by codling moth neonates. *Pharm Biol*, 53(10), 1458-1464. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.985796>
- Curval, L. G., Franca, A. d. O., Fernandes, H. J., Mendes, R. P., de Carvalho, L. R., Higa, M. G., Ferreira, E. d. C., & Dorval, M. E. C. (2017). Prevalence of intestinal parasites among inmates in Midwest Brazil. *Plos one*, 12(9), e0182248.
- Czyzewska, M. M., & Mozrzyms, J. W. (2013). Monoterpene α -thujone exerts a differential inhibitory action on GABAA receptors implicated in phasic and tonic GABAergic inhibition. *European journal of pharmacology*, 702(1-3), 38-43.
- Davis, G. M., Hipwell, H., & Boag, P. R. (2023). Oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Sex Dev*, 17(2-3), 73-83. <https://doi.org/10.1159/000531019>
- de Andrade, E. C., Leite, I. C. G., de Oliveira Rodrigues, V., & Cesca, M. G. (2010). Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *Revista de APS*, 13(2).
- Deng, L., Denham, J. E., Arya, C., Yuval, O., Cohen, N., & Haspel, G. (2021, Mar-Apr). Inhibition Underlies Fast Undulatory Locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *eNeuro*, 8(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0241-20.2020>
- Dilks, C. M., Hahnel, S. R., Sheng, Q., Long, L., McGrath, P. T., & Andersen, E. C. (2020). Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta-tubulin alleles. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 28-36.
- Dixon, M. A., Winskill, P., Harrison, W. E., & Basanez, M. G. (2021). *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From parasite biology and immunology to diagnosis and control. *Adv Parasitol*, 112, 133-217. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.03.003>
- Dube, F., Hinas, A., Delhomme, N., Åbrink, M., Svärd, S., & Tydén, E. (2023). Transcriptomics of ivermectin response in *Caenorhabditis elegans*: Integrating abamectin quantitative trait loci and comparison to the Ivermectin-exposed DA1316 strain. *Plos one*, 18(5), e0285262.
- Eastman, C., Horvitz, H. R., & Jin, Y. (1999, Aug 1). Coordinated transcriptional regulation of the unc-25 glutamic acid decarboxylase and the unc-47 GABA vesicular transporter by

- the *Caenorhabditis elegans* UNC-30 homeodomain protein. *J Neurosci*, 19(15), 6225-6234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06225.1999>
- Estevez, A. O., Mueller, C. L., Morgan, K. L., Szewczyk, N. J., Teece, L., Miranda-Vizuete, A., & Estevez, M. (2012, Oct). Selenium induces cholinergic motor neuron degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*, 33(5), 1021-1032. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.04.019>
- Fantinatti, M., & Da-Cruz, A. M. (2023). *Enterobius vermicularis* in Brazil: An integrative review. *Rev Soc Bras Med Trop*, 56, e00732023. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0073-2023>
- Ferreira, J. F., Peadar, P., & Keiser, J. (2011). In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*: trematocidal plant alcoholic extracts. *Parasitology research*, 109, 1585-1592.
- Fleming, J. T., Squire, M. D., Barnes, T. M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., Fire, A., Sulston, J. E., Barnard, E. A., Sattelle, D. B., & Lewis, J. A. (1997, Aug 1). *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci*, 17(15), 5843-5857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05843.1997>
- Gadhia, A., Barker, E., Morgan, A., & Barclay, J. W. (2024, May 30). Functional analysis of epilepsy-associated GABA(A) receptor mutations using *Caenorhabditis elegans*. *Epilepsia Open*. <https://doi.org/10.1002/epi4.12982>
- Gieseler, K., Qadota, H., & Benian, G. M. (2017, Apr 13). Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle. *WormBook*, 2017, 1-59. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.81.2>
- Hagel, I., & Giusti, T. (2010). *Ascaris lumbricoides*: an overview of therapeutic targets. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 10(5), 349-367.
- Hahnel, S. R., Dilks, C. M., Heisler, I., Andersen, E. C., & Kulke, D. (2020). *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research—Old model, new perspectives. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 237-248.
- Hajissa, K., Islam, M. A., Sanyang, A. M., & Mohamed, Z. (2022, Feb). Prevalence of intestinal protozoan parasites among school children in africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 16(2), e0009971. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009971>
- Hold, K. M., Sirisoma, N. S., Ikeda, T., Narahashi, T., & Casida, J. E. (2000, Apr 11). Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 3826-3831. <https://doi.org/10.1073/pnas.070042397>
- Holden-Dye, L., Joyner, M., O'Connor, V., & Walker, R. J. (2013, Dec). Nicotinic acetylcholine receptors: a comparison of the nAChRs of *Caenorhabditis elegans* and parasitic nematodes. *Parasitol Int*, 62(6), 606-615. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.03.004>

- Holden-Dye, L., & Walker, R. (2014). Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1-29.
- Holden-Dye, L., & Walker, R. J. (2014, Dec 16). Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-29. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.2>
- Hunt, P. R. (2017, Jan). The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol*, 37(1), 50-59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>
- Isaac, C., Turay, P., Inegbenosun, C., Ezekiel, S., Adamu, H., & Ohiolei, J. (2019). Prevalence of soil-transmitted helminths in primary school playgrounds in Edo State, southern Nigeria. *Helminthologia*, 56(4), 282-295.
- Jin, Y., Hoskins, R., & Horvitz, H. R. (1994, Dec 22-29). Control of type-D GABAergic neuron differentiation by *C. elegans* UNC-30 homeodomain protein. *Nature*, 372(6508), 780-783. <https://doi.org/10.1038/372780a0>
- Jin, Y., Jorgensen, E., Hartwig, E., & Horvitz, H. R. (1999, Jan 15). 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00539.1999>
- Johnson-Arbor, K. (2022, May). Ivermectin: a mini-review. *Clin Toxicol (Phila)*, 60(5), 571-575. <https://doi.org/10.1080/15563650.2022.2043338>
- Kalmobé, J., Ndjonka, D., Boursou, D., Vildina, J. D., & Liebau, E. (2017). Phytochemical analysis and in vitro anthelmintic activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the bovine parasite *Onchocerca ochengi* and on drug resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-12.
- Karakus, I., Tas Cengiz, Z., & Ekici, A. (2022, Mar 1). Evaluation of Intestinal Parasites and Some Clinical Symptoms in Children with Diarrhea. *Turkiye Parazitoloj Derg*, 46(1), 39-44. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.65375> (Ishalli Cocuklarda Intestinal Parazitler ve Klinik Belirtilerin Degerlendirilmesi.)
- Kato, M., Kolotuev, I., Cunha, A., Gharib, S., & Sternberg, P. W. (2021, Jan 5). Extrasynaptic acetylcholine signaling through a muscarinic receptor regulates cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.1904338118>
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.
- Kumarasingha, R., Young, N. D., Yeo, T. C., Lim, D. S. L., Tu, C. L., Palombo, E. A., Shaw, J. M., Gasser, R. B., & Boag, P. R. (2019, Apr 25). Transcriptional alterations in *Caenorhabditis elegans* following exposure to an anthelmintic fraction of the plant *Picria fel-terrae* Lour. *Parasit Vectors*, 12(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3429-4>
- Lachenmeier, D. W., Emmert, J., Kuballa, T., & Sartor, G. (2006, Apr 20). Thujone--cause of absinthism? *Forensic Sci Int*, 158(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.010>

- Lachenmeier, D. W., Walch, S. G., Padosch, S. A., & Kroner, L. U. (2006). Absinthe--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(5), 365-377. <https://doi.org/10.1080/10408690590957322>
- Lans, C., Turner, N., Khan, T., & Brauer, G. (2007). Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. *Veterinary parasitology*, 148(3-4), 325-340.
- Lee, J. Y., Park, H., Lim, W., & Song, G. (2020, Jun). alpha,beta-Thujone suppresses human placental choriocarcinoma cells via metabolic disruption. *Reproduction*, 159(6), 745-756. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0018>
- Liu, M., Kipanga, P., Mai, A. H., Dhondt, I., Braeckman, B. P., De Borggraeve, W., & Luyten, W. (2018, Sep). Bioassay-guided isolation of three anthelmintic compounds from *Warburgia ugandensis* Sprague subspecies *ugandensis*, and the mechanism of action of polygodial. *Int J Parasitol*, 48(11), 833-844. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.009>
- Liu, M., Lu, J.-G., Yang, M.-R., Jiang, Z.-H., Wan, X., & Luyten, W. (2022). Bioassay-guided isolation of anthelmintic components from *Semen pharbitidis*, and the mechanism of action of pharbitin. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15739.
- Liu, Y., LeBoeuf, B., & Garcia, L. R. (2007, Feb 7). G alpha(q)-coupled muscarinic acetylcholine receptors enhance nicotinic acetylcholine receptor signaling in *Caenorhabditis elegans* mating behavior. *J Neurosci*, 27(6), 1411-1421. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4320-06.2007>
- Mandal, H. R., Katel, S., Subedi, S., & Shrestha, J. (2021). Plant Parasitic Nematodes and their management in crop production: a review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, 4(2), 327-338.
- Massara, C. L., Ferreira, R. S., Andrade, L. D. d., Guerra, H. L., & Carvalho, O. d. S. (2003). Atividade de detergentes e desinfetantes sobre a evolução dos ovos de *Ascaris lumbricoides*. *Cadernos de Saúde Pública*, 19(1), 335-340.
- McCoy, C. J., Atkinson, L. E., Robb, E., Marks, N. J., Maule, A. G., & Mousley, A. (2017, Dec). Tool-Driven Advances in Neuropeptide Research from a Nematode Parasite Perspective. *Trends Parasitol*, 33(12), 986-1002. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.009>
- McHugh, M., Williams, P., Verma, S., Powell-Coffman, J. A., Robertson, A. P., & Martin, R. J. (2020, Aug). Cholinergic receptors on intestine cells of *Ascaris suum* and activation of nAChRs by levamisole. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 13, 38-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.04.002>
- McIntire, S. L., Jorgensen, E., & Horvitz, H. R. (1993, Jul 22). Genes required for GABA function in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 364(6435), 334-337. <https://doi.org/10.1038/364334a0>
- Miraj, S., & Kiani, S. (2016). A review study of therapeutic effects of *Salvia officinalis* L. *Der Pharmacia Lettre*, 8(6), 299-303.
- Ndjonka, D., Abladam, E., Djafsia, B., Ajonina-Ekoti, I., Achukwi, M., & Liebau, E. (2014). Anthelmintic activity of phenolic acids from the axlewood tree *Anogeissus leiocarpus* on

- the filarial nematode *Onchocerca ochengi* and drug-resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of helminthology*, 88(4), 481-488.
- Neveu, C., Charvet, C. L., Fauvin, A., Cortet, J., Beech, R. N., & Cabaret, J. (2010, Jul). Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. *Pharmacogenet Genomics*, 20(7), 414-425. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328338ac8c>
- Nicholl, G. C., Jawad, A. K., Weymouth, R., Zhang, H., & Beg, A. A. (2017, May). Pharmacological characterization of the excitatory 'Cys-loop' GABA receptor family in *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol*, 174(9), 781-795. <https://doi.org/10.1111/bph.13736>
- Ok, K. S., Kim, Y. S., Song, J. H., Lee, J. H., Ryu, S. H., Lee, J. H., Moon, J. S., Whang, D. H., & Lee, H. K. (2009, Sep). *Trichuris trichiura* infection diagnosed by colonoscopy: case reports and review of literature. *Korean J Parasitol*, 47(3), 275-280. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.3.275>
- Özben, M., von Samson-Himmelstjerna, G., Freiin von Streit, M. K., Wilkes, E. J., Hughes, K. J., & Krücken, J. (2022). Absence of polymorphisms in codons 167, 198 and 200 of all seven β -tubulin isotypes of benzimidazole susceptible and resistant *Parascaris* spp. specimens from Australia. *Pathogens*, 11(5), 490.
- Padosch, S. A., Lachenmeier, D. W., & Kroner, L. U. (2006, May 10). Absinthism: a fictitious 19th century syndrome with present impact. *Subst Abuse Treat Prev Policy*, 1, 14. <https://doi.org/10.1186/1747-597X-1-14>
- Pallotto, L. M., Dilks, C. M., Park, Y.-J., Smit, R. B., Lu, B. T., Gopalakrishnan, C., Gilleard, J. S., Andersen, E. C., & Mains, P. E. (2022). Interactions of *Caenorhabditis elegans* β -tubulins with the microtubule inhibitor and anthelmintic drug albendazole. *Genetics*, 221(4), iyac093.
- Pallotto, L. M., Dilks, C. M., Park, Y. J., Smit, R. B., Lu, B. T., Gopalakrishnan, C., Gilleard, J. S., Andersen, E. C., & Mains, P. E. (2022, Jul 30). Interactions of *Caenorhabditis elegans* beta-tubulins with the microtubule inhibitor and anthelmintic drug albendazole. *Genetics*, 221(4). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac093>
- Park, Y. S., Kim, S., Shin, Y., Choi, B., & Cho, N. J. (2003, Sep 5). Alternative splicing of the muscarinic acetylcholine receptor GAR-3 in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(4), 961-965. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01508-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01508-0)
- Peden, A. S., Mac, P., Fei, Y. J., Castro, C., Jiang, G., Murfitt, K. J., Miska, E. A., Griffin, J. L., Ganapathy, V., & Jorgensen, E. M. (2013, Dec). Betaine acts on a ligand-gated ion channel in the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Nat Neurosci*, 16(12), 1794-1801. <https://doi.org/10.1038/nn.3575>
- Pelkonen, O., Abass, K., & Wiesner, J. (2013, Feb). Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: toxicological assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*, 65(1), 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.002>

- Pereira, L., Kratsios, P., Serrano-Saiz, E., Sheftel, H., Mayo, A. E., Hall, D. H., White, J. G., LeBoeuf, B., Garcia, L. R., Alon, U., & Hobert, O. (2015, Dec 25). A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *Elife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.12432>
- Pineda-Alegria, J. A., Sanchez-Vazquez, J. E., Gonzalez-Cortazar, M., Zamilpa, A., Lopez-Arellano, M. E., Cuevas-Padilla, E. J., Mendoza-de-Gives, P., & Aguilar-Marcelino, L. (2017, Dec). The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *J Med Food*, 20(12), 1184-1192. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0031>
- Rasmussen, L. H., & Rosenfeld, M. (2020, Jul 15). A rapid GC-FID method for determination of sabinene, beta-pinene, alpha-thujone and beta-thujone in the essential oil of Kitchen Sage (*Salvia officinalis* L.). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1149, 122159. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122159>
- Rathor, L., Curry, S., Park, Y., McElroy, T., Robles, B., Sheng, Y., Chen, W. W., Min, K., Xiao, R., Lee, M. H., & Han, S. M. (2024, Mar 25). Mitochondrial stress in GABAergic neurons non-cell autonomously regulates organismal health and aging. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.20.585932>
- Reed, H. M., Han, Z., & Schroeder, N. E. (2023, Feb). GABA Immunoreactivity and Pharmacological Effects vary Among Stylet-Bearing Nematodes. *J Nematol*, 55(1), 20230049. <https://doi.org/10.2478/jofnem-2023-0049>
- Reyes-Guerrero, D. E., Jiménez-Jacinto, V., Alonso-Morales, R. A., Alonso-Díaz, M. Á., Maza-Lopez, J., Camas-Pereyra, R., Olmedo-Juárez, A., Higuera-Piedrahita, R. I., & López-Arellano, M. E. (2023). Assembly and analysis of *Haemonchus contortus* transcriptome as a tool for the knowledge of Ivermectin resistance mechanisms. *Pathogens*, 12(3), 499.
- Risi, G., Aguilera, E., Lados, E., Suarez, G., Carrera, I., Alvarez, G., & Salinas, G. (2019, Mar 17). *Caenorhabditis elegans* Infrared-Based Motility Assay Identified New Hits for Nematicide Drug Development. *Vet Sci*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/vetsci6010029>
- Rivera, E., Cid, M. P., Zunino, P., Baiardi, G., & Salvatierra, N. A. (2014). Central α - and β -thujone: Similar anxiogenic-like effects and differential modulation on GABA_A receptors in neonatal chicks. *Brain research*, 1555, 28-35.
- Rodrigues, D. T., Padilha, H. A., Soares, A. T. G., de Souza, M. E. O., Guerra, M. T., & Ávila, D. S. (2024). The *Caenorhabditis elegans* neuroendocrine system and their modulators: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 112191.
- Rufener, L., Bedoni, N., Baur, R., Rey, S., Glauser, D. A., Bouvier, J., Beech, R., Sigel, E., & Puoti, A. (2013). *acr-23* Encodes a monepantel-sensitive channel in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003524. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003524>
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F., & Angayarkanni, J. (2020, Apr). A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Curr Microbiol*, 77(4), 534-544. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01839-w>

- Schar, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., & Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), e2288. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>
- Scholte, R. G. C., dos Santos Carvalho, O., de Lima, G. M. N., Araujo, A. D., & Massara, C. L. (2015). Pesquisa de ovos de helmintos intestinais nos terminais aeroportuários Carlos Drummond de Andrade (Pampulha)-Belo Horizonte e Tancredo Neves–Confins–Minas Gerais. *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, 44(3), 303-311.
- Schuske, K., Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2004, Jul). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci*, 27(7), 407-414. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>
- Schuske, K., Palfreyman, M. T., Watanabe, S., & Jorgensen, E. M. (2007, Jul). UNC-46 is required for trafficking of the vesicular GABA transporter. *Nat Neurosci*, 10(7), 846-853. <https://doi.org/10.1038/nn1920>
- Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Semwal, P., Painuli, S., Badoni, H., Ezzat, S. M., Farid, M. M., Merghany, R. M., Aborehab, N. M., & Salem, M. A. (2022). *Artemisia* spp.: an update on its chemical composition, pharmacological and toxicological profiles. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(1), 5628601.
- Silva, A. C., Dos Santos, A. G. R., Pieretti, J. C., Rolim, W. R., Seabra, A. B., & Ávila, D. S. (2023). Iron oxide/silver hybrid nanoparticles impair the cholinergic system and cause reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Food and Chemical Toxicology*, 179, 113945.
- Sloan, M. A., Reaves, B. J., Maclean, M. J., Storey, B. E., & Wolstenholme, A. J. (2015, Nov). Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits from parasitic nematodes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol*, 204(1), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.12.006>
- Stiernagle, T. (2006, Feb 11). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Sultan, A., Yang, K. S., Isaev, D., Nebrisi, E. E., Syed, N., Khan, N., Howarth, C. F., Sadek, B., & Oz, M. (2017, Jun 1). Thujone inhibits the function of alpha(7)-nicotinic acetylcholine receptors and impairs nicotine-induced memory enhancement in one-trial passive avoidance paradigm. *Toxicology*, 384, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.04.005>
- Tahar, A. S., Bilung, L. M., Apun, K., Richard, R. L., & Lim, Y. A. L. (2021, Sep 1). Epidemiological study of human intestinal parasites in Sarawak, East Malaysia: A review. *Trop Biomed*, 38(3), 377-386. <https://doi.org/10.47665/tb.38.3.083>
- Tariq, K., Chishti, M., Ahmad, F., & Shawl, A. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary parasitology*, 160(1-2), 83-88.
- Teixeira, P. A., Fantinatti, M., Gonçalves, M. P., & da Silva, J. S. (2020). Parasitoses intestinais e saneamento básico no Brasil: estudo de revisão integrativa. *Brazilian Journal of Development*, 6(5), 22867-22890.

- Tejeda-Benitez, L., & Olivero-Verbel, J. (2016). *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. *Rev Environ Contam Toxicol*, 237, 1-35.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_1
- Thamm, I., Tiefenbacher, K., & Rychlik, M. (2018, Dec 3). Quantification of alpha-Thujone and Its Metabolites in Human Urine after Consumption of a Sage Infusion Using Stable Isotope Dilution Assays. *Toxins (Basel)*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/toxins10120511>
- Thapliyal, S., & Babu, K. (2018). *C. elegans* Locomotion: Finding Balance in Imbalance. *Adv Exp Med Biol*, 1112, 185-196. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3065-0_14
- Tileubayeva, Z., Avdeenko, A., Avdeenko, S., Stroiteleva, N., & Kondrashev, S. (2021). Plant-parasitic nematodes affecting vegetable crops in greenhouses. *Saudi journal of biological sciences*, 28(9), 5428-5433.
- Vairoletti, F., Baron, A., Saiz, C., Mahler, G., & Salinas, G. (2021). Increased sensitivity of an infrared motility assay for nematicide discovery. *MicroPubl Biol*, 2021.
<https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000500>
- Vlaar, L. E., Bertran, A., Rahimi, M., Dong, L., Kammenga, J. E., Helder, J., Goverse, A., & Bouwmeester, H. J. (2021). On the role of dauer in the adaptation of nematodes to a parasitic lifestyle. *Parasites & Vectors*, 14, 1-20.
- Wang, S., Tang, N. H., Lara-Gonzalez, P., Zhao, Z., Cheerambathur, D. K., Prevo, B., Chisholm, A. D., Desai, A., & Oegema, K. (2017, Jul 15). A toolkit for GFP-mediated tissue-specific protein degradation in *C. elegans*. *Development*, 144(14), 2694-2701.
<https://doi.org/10.1242/dev.150094>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1983). Factors that determine connectivity in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 48 Pt 2, 633-640. <https://doi.org/10.1101/sqb.1983.048.01.067>
- White, P. S., Penley, M. J., Tierney, A. R. P., Soper, D. M., & Morran, L. T. (2019). Dauer life stage of *Caenorhabditis elegans* induces elevated levels of defense against the parasite *Serratia marcescens*. *Scientific Reports*, 9(1), 11575.
- Wikman-Jorgensen, P., Requena-Mendez, A., & Llenas-Garcia, J. (2021). A Review on Strongyloidiasis in Pregnant Women. *Res Rep Trop Med*, 12, 219-225.
<https://doi.org/10.2147/RRTM.S282268>
- Williams, J. D., Yazarians, J. A., Almeyda, C. C., Anderson, K. A., & Boyce, G. R. (2016, Jun 1). Detection of the Previously Unobserved Stereoisomers of Thujone in the Essential Oil and Consumable Products of Sage (*Salvia officinalis* L.) Using Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*, 64(21), 4319-4326. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01065>
- Wohlschlegel, J., Finkbeiner, C., Hoffer, D., Kierney, F., Prieve, A., Murry, A. D., Haugan, A. K., Ortuno-Lizaran, I., Rieke, F., Golden, S. A., & Reh, T. A. (2023, Dec 12). ASCL1 induces neurogenesis in human Muller glia. *Stem Cell Reports*, 18(12), 2400-2417.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2023.10.021>

- YILDIZ, K., Basalan, M., Duru, Ö., & GÖKPINAR, S. (2011). Antiparasitic efficiency of Artemisia absinthium on Toxocara cati in naturally infected cats. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 35(1), 10.
- Yones, D. A., Taher, G. A., & Ibraheim, Z. Z. (2011). In vitro effects of some herbs used in Egyptian traditional medicine on viability of protoscolices of hydatid cysts. *The Korean journal of parasitology*, 49(3), 255.
- Zámboriné Németh, É., & Thi Nguyen, H. (2020). Thujone, a widely debated volatile compound: What do we know about it? *Phytochemistry reviews*, 19, 405-423.
- Zhao, J., Gao, L., Nurrish, S., & Kaplan, J. M. (2023, Oct 31). Post-synaptic GABA(A) receptors potentiate transmission by recruiting CaV2 channels to their inputs. *Cell Rep*, 42(10), 113161. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113161>
- Zhou, X., & Bessereau, J. L. (2019). Molecular Architecture of Genetically-Tractable GABA Synapses in *C. elegans*. *Front Mol Neurosci*, 12, 304. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00304>