



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Melania Santer

**Avaliação do possível efeito protetor da metformina via gene SKN-1 em
Caenorhabditis elegans submetidos à ferroptose**

Florianópolis
2023

Melania Santer

**Avaliação do possível efeito protetor da metformina via gene SKN-1 em
Caenorhabditis elegans submetidos à ferroptose**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Título de Mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Marcelo Farina, Dr.

Florianópolis - SC

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santer, Melania

Avaliação do possível efeito protetor da metformina via gene SKN-1 em *Caenorhabditis elegans* submetidos à ferroptose / Melania Santer ; orientador, Marcelo Farina, 2023.

60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Iron-overload. 3. Ferroptose. 4. Nrf2/SKN-1. 5. *Caenorhabditis elegans*. I. Farina, Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. III. Título.

Melania Santer

Avaliação do possível efeito protetor da metformina via gene SKN-1 em *Caenorhabditis elegans* submetidos à ferroptose

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 28 de abril de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Daiana Silva de Ávila, Dra.

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Marcelo Farina, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2023

Dedico essa dissertação aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador Professor Dr. Marcelo Farina, pela valiosa orientação, pelo exemplo de profissionalismo, ética e dedicação; pela confiança; por todo o conhecimento que me foi passado; por modelar meu pensamento científico e por ter me dado oportunidade de participar deste projeto. Será um exemplo que levarei para toda a minha vida.

Agradeço a doutoranda Josiane Mann por ter me ensinado toda a parte prática com *C. elegans*, base para a realização dos experimentos desta dissertação.

Aos demais colegas e amigos do laboratório de Experimentação em Neuropatologias: Mauricio Jacques, Carmem L. Sperlich, Sabrina H. Ilha e Leonardo Vieira, agradeço por todas as discussões científicas, apoio e ajudas experimentais no laboratório.

Agradeço a todos os meus amigos da UFSC: Hugo Tolentino; Ana Paula Valverde; Louise Castro de Jesus; Marina Mello; Karoline Almeida; Cláudio H. Dahne; Patricia Marzola; Glorister A. Altê; Gabriela D. Karasiak e Yasmin Camile por todo apoio que me deram ao longo do meu mestrado, estou muito feliz em ter a amizade de vocês ao longo desses dois anos. Aos meus amigos da vida Emanuela A. M. S. Volpato, Gianfrancis D. Ugalde e Nataly B. Duarte, muito obrigada pelo incentivo e apoio desde o início do mestrado. Agradeço a Ana Raquel D. Fonseca por todos os desabafos e direções mostradas ao longo desses dois anos. Agradeço também ao laboratório GPEOSCEL, principalmente ao Mauro E. M. Nunes, que me ensinou a base da iniciação científica e me mostrou o amor pela Bioquímica. E ao Pedro Borges de Souza e a Heloísa Bárbara Gabe os meus grandes agradecimentos por todo apoio, incentivos, comemorações e desabafos, base emocional, confiança e ajuda ao longo desses dois anos, essa dissertação é dedicada a vocês.

Agradeço aos professores da UNIPAMPA, em especial ao Julio Cesar B. Marinho, a Marcia Regina Spies e ao Jeferson L. Franco, assim como aos professores da UFSC do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que me incentivaram e contribuíram para o meu conhecimento científico.

Agradeço os membros do LAMEB, pela disponibilização e pelo auxílio na utilização dos equipamentos necessários para a realização dos experimentos. Também agradeço ao PPG Bioquímica e a Universidade Federal de Santa Catarina, que me permitiram adquirir mais um grau acadêmico.

Meus agradecimentos aos membros da banca examinadora, que dedicaram seu tempo para ler e contribuir com esta dissertação de mestrado.

Agradeço pelo apoio financeiro da CAPES, pela bolsa de mestrado.

E finalmente, agradeço por todo apoio e incentivo dos meus familiares, principalmente dos meus irmãos, cunhadas, mãe e pai.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano” (Isaac Newton)

RESUMO

O ferro é um metal essencial à manutenção da vida de inúmeras espécies animais, incluindo a humana. Apesar da essencialidade deste elemento químico, seu excesso pode levar a uma condição denominada “sobrecarga de ferro” (do inglês, *iron-overload*). Neste contexto, o excesso de ferro pode contribuir para a formação de radicais livres e oxidação de fosfolipídios de membrana, o que atualmente tem sido relacionado à morte celular ferroptótica. Esse tipo de morte celular regulada e não-apoptótica caracteriza-se principalmente pela oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição dos níveis do antioxidante glutathiona (GSH). Dentre as moléculas endógenas que podem inibir o desenvolvimento da ferroptose, tem-se a glutathiona peroxidase 4 (GPx4), o sistema xCT e o fator de transcrição Nrf-2 (codificado pelo gene NRF-2 em mamíferos), fator ortólogo ao gene SKN-1 no nematoide *Caenorhabditis elegans*. Este fator de transcrição desempenha um papel chave na expressão de diversas proteínas antioxidantes, incluindo o próprio sistema xCT. A metformina, um fármaco extensivamente prescrito para o tratamento do diabetes, pode modular positivamente a via do Nrf-2 em mamíferos, através de um leve aumento da produção mitocondrial de EROs, ativando defesas antioxidantes endógenas. Entretanto, o papel da metformina na regulação da ferroptose ainda é pouco conhecido. Desta forma, a presente dissertação teve como objetivo a realização de um estudo para investigar se a metformina pode prevenir a morte celular ferroptótica, através do fator SKN-1, induzida por uma sobrecarga de ferro com citrato férrico amoniacal (FAC) em *C. elegans*. De forma a alcançar o objetivo geral, a metodologia foi dividida em quatro fases principais: (I) análise da toxicidade (letalidade) induzida por FAC e metformina; (II) análise do possível efeito protetor da metformina contra a toxicidade induzida por FAC; (III) avaliação de um marcador de ferroptose (peroxidação lipídica) nos animais expostos ao FAC e/ou metformina; e (IV) avaliação do efeito da metformina na expressão da proteína glutathiona-S-transferase (GST-4), a qual representa um alvo *downstream* do fator SKN-1. Nossos resultados demonstraram que a metformina, quando em contato prévio com bactérias *Escherichia coli* OP50, protege contra a mortalidade e a peroxidação lipídica induzida pelo modelo de *iron-overload* em nematoides selvagens (cepa N2), porém, não em nematoides nocautes para o gene SKN-1 (cepa QV225). Além disso, o tratamento com 50 mM de metformina (após metabolizada pela bactéria *E. coli* - OP50), durante 44 horas e iniciado em estágio L1, aumentou a expressão da proteína GST-4 marcada com GFP em animais tipo selvagens N2 (59%); porém, na cepa nocaute para SKN-1, o aumento da expressão foi pouco expressivo (17%). Em conjunto, nossos dados demonstram que a proteção induzida pelo tratamento com metformina contra a mortalidade e a peroxidação lipídica induzidos pelo modelo de *iron-overload* (exposição ao FAC) depende da metabolização da metformina pela bactéria *E. coli* e do gene SKN-1 em *C. elegans*.

Palavras-chave: *Iron-overload*, Ferroptose, Nrf-2, *Caenorhabditis elegans*, SKN-1.

ABSTRACT

Iron is an essential metal for the maintenance of life in several animal species, including humans. Despite the essentiality of this element, its excess can lead to a condition called "iron-overload". In this context, excess iron can contribute to the generation of free radicals and oxidation of membrane phospholipids, which have now been linked to ferroptotic cell death. This type of regulated and non-apoptotic cell death is mainly characterized by the oxidation of polyunsaturated fatty acids, increased levels of reactive oxygen species (ROS), and decreased levels of the antioxidant glutathione (GSH). Among the endogenous molecules that can inhibit ferroptosis, there are glutathione peroxidase 4 (GPx4), xCT system, and transcription factor Nrf-2 (encoded by the NRF-2 gene in mammals), an orthologous factor to SKN-1 gene present in the nematode *Caenorhabditis elegans*. This transcription factor plays a key role in the expression of several antioxidant proteins, including the xCT system itself. Metformin, a drug extensively prescribed for the treatment of diabetes, can positively modulate the Nrf-2 pathway in mammals through a slight increase in mitochondrial production of ROS, activating endogenous antioxidant defenses. However, the role of metformin in the regulation of ferroptosis is still poorly understood. Thus, the present dissertation aimed to conduct a study to investigate whether metformin can prevent ferroptotic cell death, through SKN-1 factor, induced by iron overload - ammoniacal ferric citrate (FAC) treatment - in *C. elegans*. In order to achieve the overall objective, the methodology was divided into four main phases: (I) analysis of the toxicity (lethality) induced by FAC and metformin; (II) analysis of the possible protective effect of metformin against FAC-induced toxicity; (III) evaluation of a marker of ferroptosis (lipid peroxidation) in animals exposed to FAC and/or metformin; and (IV) evaluation of the effect of metformin on the expression of glutathione-S-transferase (GST-4) protein, which represents a downstream target of SKN-1. Our results demonstrated that metformin, when pre-incubated with *Escherichia coli* OP50 bacteria, protects against mortality and lipid peroxidation induced by the iron-overload model in wild type nematodes (N2 strain), but not in SKN-1 knockout nematodes (strain QV225). Furthermore, a 44 hours (initiated at L1 stage) treatment with 50 mM metformin, after OP50 bacteria metabolism, increased GFP-tagged GST-4 protein expression in N2 wild-type animals (59%); however, in the SKN-1 knockout strain, the increase in expression was negligible (17%). Taken together, our data demonstrate that the protection of metformin against mortality and lipid peroxidation induced by the iron-overload model in *C. elegans* is dependent on metformin metabolism by *E. coli* bacteria and on the SKN-1 gene.

Keywords: *Iron-overload*, Ferroptosis, Nrf-2, *Caenorhabditis elegans*, SKN-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Homeostase do ferro intracelular.....	17
Figura 2 – Homeostase do ferro e via da Ferroptose.....	19
Figura 3 – Translocação de Nrf-2 para o núcleo e ativação de genes alvos.....	21
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	23
Figura 5 - <i>C. elegans</i> expressa genes ortólogos aos de mamíferos no metabolismo do ferro.....	24
Figura 6 – Ativação de SKN-1 pela metformina promovendo aumento da longevidade.....	26
Figura 7 – Delineamento experimental.....	31
Figura 8 – Modelo de <i>Iron-overload</i> induz mortalidade em <i>C. elegans</i>	35
Figura 9 – Metformina não protege da mortalidade induzida por um modelo de <i>iron-overload</i> em <i>C. elegans</i>	36
Figura 10 – A metformina depende da metabolização bacteriana para protege da mortalidade induzida por um modelo de <i>iron-overload</i> em <i>C. elegans</i>	38
Figura 11 – Metformina diminui a peroxidação lipídica induzida por um modelo de <i>iron-overload</i> em <i>C. elegans</i>	40
Figura 12 – Modelo de <i>Iron-overload</i> induz mortalidade em <i>C. elegans</i> nocautes para o gene SKN-1.....	41
Figura 13 – A metformina não protege da mortalidade induzida pelo modelo de <i>iron-overload</i> em <i>C. elegans</i> nocautes para o gene SKN-1.....	42
Figura 14 – A metformina não protege contra a peroxidação lipídica induzida por um modelo de <i>iron-overload</i> em <i>C. elegans</i> nocautes para o gene SKN-1.....	44
Figura 15 – Metformina aumenta a expressão de GST-4 através da ativação do gene SKN-1 em <i>C. elegans</i>	46
Figura 16 – Possível via de atuação da metformina em <i>C. elegans</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fe ²⁺	Ferro Ferroso
Fe ³⁺	Ferro Férrico
Dcytb	Citocromo B Duodenal
DMT1	Proteína transportadora de metal divalente 1
HCP-1	Proteína transportadora de heme 1
TFR1	Receptor de transferrina 1
TFR2	Receptor de transferrina 2
STEAP	Antígeno Epitelial Seis-Transmembranar da Próstata
FPN	Ferroportina
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
LIP	Pool de ferro lábil
ROS	Espécies reativas de oxigênio
LOXs	Lipo-oxigenases
·OH	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
GPX4	Glutathiona peroxidase 4
RSL3	Composto químico inibidor da GPx-4
GSH	Glutathiona
Sistema xCT	Proteína transmembrana que realiza o antiporte de cistina/glutamato
AA	Ácido araquidônico
AdA	Ácido adrênico
NRF-2	Fator Nuclear Fator 2 Relacionado ao Eritróide 2
Keap-1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
ARE	Região de elementos de resposta antioxidante
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
SKN-1	Fator de Transcrição Skinhead-1
DM II -	Diabetes Mellitus tipo II
OCT-1	Transportador catiônico orgânico tipo 1
OCT-2	Transportador catiônico orgânico tipo 2
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ACC	Acetil-CoA carboxilase
GLUT-4	Transportador de glicose 4
aak-2	Proteína quinase ativada por 5'-AMP subunidade catalítica alfa-2
FAC	Citrato férrico amoniacal
NGM	Meio de crescimento de nematóides
CTL	Controle
GST-4	Glutathiona-S-transferase 4
t-BHQ	Terc Butil Hidroquinona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 FERRO E <i>IRON-OVERLOAD</i>	15
1.2 FERROPTOSE.....	17
1.3 ATIVAÇÃO E IMPORTÂNCIA DO GENE NRF-2	20
1.4 ORGANISMO MODELO <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
1.5 METFORMINA	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3.OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 CEPAS DE <i>C. elegans</i> E MANUTENÇÃO	29
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.3 CURVA DE LETALIDADE - FAC (MODELO <i>IRON-OVERLOAD</i>).....	31
4.4 EXPOSIÇÃO E POSSÍVEL PROTEÇÃO DA METFORMINA	32
4.4.1 Exposição direta do <i>C. elegans</i> á metformina.....	32
4.4.2 Suplementação do ágar com metformina.....	32
4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA - C11 BODIPY 581/591	33
4.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA – CONFOCAL.....	34
4.7 ANÁLISES ESTÁTISTICAS	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1 MODELO DE <i>IRON-OVERLOAD</i> INDUZ MORTALIDADE EM <i>C. elegans</i>	35
5.2 METFORMINA NÃO PROTEGE DA MORTALIDADE INDUZIDA POR UM MODELO DE <i>IRON-OVERLOAD</i> EM <i>C. elegans</i>	35
5.3 A METFORMINA DEPENDE DA METABOLIZAÇÃO BACTERIANA PARA PROTEGE DA MORTALIDADE INDUZIDA POR UM MODELO DE <i>IRON-OVERLOAD</i> EM <i>C. elegans</i>	37
5.4 METFORMINA DIMINUI A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA POR UM MODELO DE <i>IRON-OVERLOAD</i> EM <i>C. elegans</i>	38
5.5 MODELO DE <i>IRON-OVERLOAD</i> INDUZ MORTALIDADE EM <i>C. elegans</i> NOCAUTES PARA O GENE SKN-1.....	41

5.6 A METFORMINA NÃO PROTEGE DA MORTALIDADE INDUZIDA PELO MODELO DE IRON-OVERLOAD EM <i>C. elegans</i> NOCAUTES PARA O GENE SKN-1.....	42
5.7 A METFORMINA NÃO PROTEGE CONTRA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA POR UM MODELO DE <i>IRON-OVERLOAD</i> EM <i>C. elegans</i> NOCAUTES PARA O GENE SKN-1.....	42
5.8 METFORMINA AUMENTA A EXPRESSÃO DE GST-4 ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DO GENE SKN-1 EM <i>C. elegans</i>	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 FERRO E *IRON-OVERLOAD*

O ferro é um metal de transição fundamental para a realização de funções essenciais no organismo humano, mantendo a saúde e a vitalidade celular. Manter o equilíbrio desse mineral é de suma importância para que processos bioquímicos essenciais possam ocorrer normalmente. Dentre tais processos, destaca-se a proliferação celular (LE; RICHARDSON, 2002), a resposta imune (MARTINS; ALMEIDA; LIMA; KAPITÃO *et al.*, 2017), a respiração mitocondrial (VOLANI; DOERRIER; DEMETZ; HASCHKA *et al.*, 2017) e a síntese de DNA (LEDERMAN; COHEN; LEE; FREEDMAN *et al.*, 1984).

O ferro, no organismo humano, é adquirido principalmente através de duas formas: dieta ou reciclagem de eritrócitos senescentes (LANE; BAE; MERLOT; SAHNI *et al.*, 2015). A absorção do ferro, realizada no duodeno e na porção proximal do jejuno, se dá através da importação de ferro ferroso (Fe^{2+} ; ferro heme) e ferro férrico (Fe^{3+} ; não heme) pelos enterócitos, ocorrendo de duas formas principais, sendo elas por endocitose ou via importadores de ferro ferroso (Fe^{2+}) (REICHERT; DE FREITAS; SAMPAIO-SILVA; ROKITA-ROSA *et al.*, 2020).

No que se refere à importação de Fe^{2+} , sabe-se que a enzima citocromo B duodenal (Dcytb) ou a enzima redutase férrica dos eritrócitos podem reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (MCKIE; BARROW; LATUNDE-DADA; ROLFS *et al.*, 2001) que, posteriormente, é transportado para o meio intracelular pela proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1) e armazenado (**Figura 1**). Já o Fe^{2+} da dieta ligado ao heme é internalizado pela proteína transportadora de heme 1 (HCP-1) (ROUAULT, 2005); uma vez internalizado na célula, o ferro ferroso é armazenado como hemossiderina e/ou ferritina, evitando a ocorrência da reação de Fenton (REICHERT; DE FREITAS; SAMPAIO-SILVA; ROKITA-ROSA *et al.*, 2020).

No processo de endocitose, principal via de importação de ferro nas células, a importação do Fe^{3+} é mediada via receptor de transferrina 1 (TFR1) (**Figura 1**), sendo o receptor de maior afinidade pelo ferro, e pelo receptor de transferrina 2 (TFR2) (KAWABATA; GERMAIN; VUONG; NAKAMAKI *et al.*, 2000; SHEOKAND; KUMAR; MALHOTRA; TILLU *et al.*, 2013; WEST; BENNETT; SELLERS; ANDREWS *et al.*,

2000). O Fe^{3+} liga-se à transferrina (proteína de alta afinidade por este cátion trivalente) e o complexo holotransferrina-TFR1 é mobilizado para os endossomos, internalizado através de endocitose mediada por receptor (AISEN, 2004). O Fe^{3+} é então liberado da transferrina e, através de um processo de oxidação-redução, é convertido em Fe^{2+} (reação catalisada por uma redutase da família da STEAP - metalorredutase STEAP3) (KNUTSON, 2007; OHGAMI; CAMPAGNA; GREER; ANTIOCHOS *et al.*, 2005). Posteriormente, o Fe^{2+} é liberado do endossomo para o citoplasma via transportador de metal divalente 1 (DMT-1), onde pode ser utilizado para várias funções metabólicas, armazenado na ferritina ou permanecer lábil (REICHERT; DE FREITAS; SAMPAIO-SILVA; ROKITA-ROSA *et al.*, 2020).

O armazenamento do ferro intracelular se dá majoritariamente pela ligação do Fe^{2+} à proteína ferritina (AROSIO; LEVI, 2002). No interior da estrutura proteica da ferritina, o Fe^{2+} está praticamente indisponível para realizar reações redox e, desta forma, também possui pequena capacidade de causar toxicidade, podendo ser transportado para o meio extracelular através da ferroportina. No citoplasma, o Fe^{2+} é principalmente encontrado em seu estável solúvel e quelatável (ferro lábil), o qual pode estar ligado a compostos de baixa massa, como peptídeos, carboxilatos e fosfatos, ou mesmo estar em sua forma livre (CABANTCHIK, 2014).

Quando os níveis séricos de ferro estão baixos, o ferro armazenado nas células é mobilizado para o meio extracelular pela ferroportina (FPN), podendo ser regulado negativamente pela hepcidina (GANZ, 2008). Contudo, o ferro mobilizado para o meio extracelular está no estado Fe^{2+} (ferroso) e, desta forma, necessita de uma reação de oxidação (catalisada pela ação de enzimas oxidases: hefestina em enterócitos, e ceruloplasmina em hepatócitos e macrófagos) para formar Fe^{3+} , o qual pode ligar-se à transferrina (apotransferrina) sérica, podendo assim ser transportado pelo corpo (GANZ, 2008; REICHERT; DE FREITAS; SAMPAIO-SILVA; ROKITA-ROSA *et al.*, 2020).

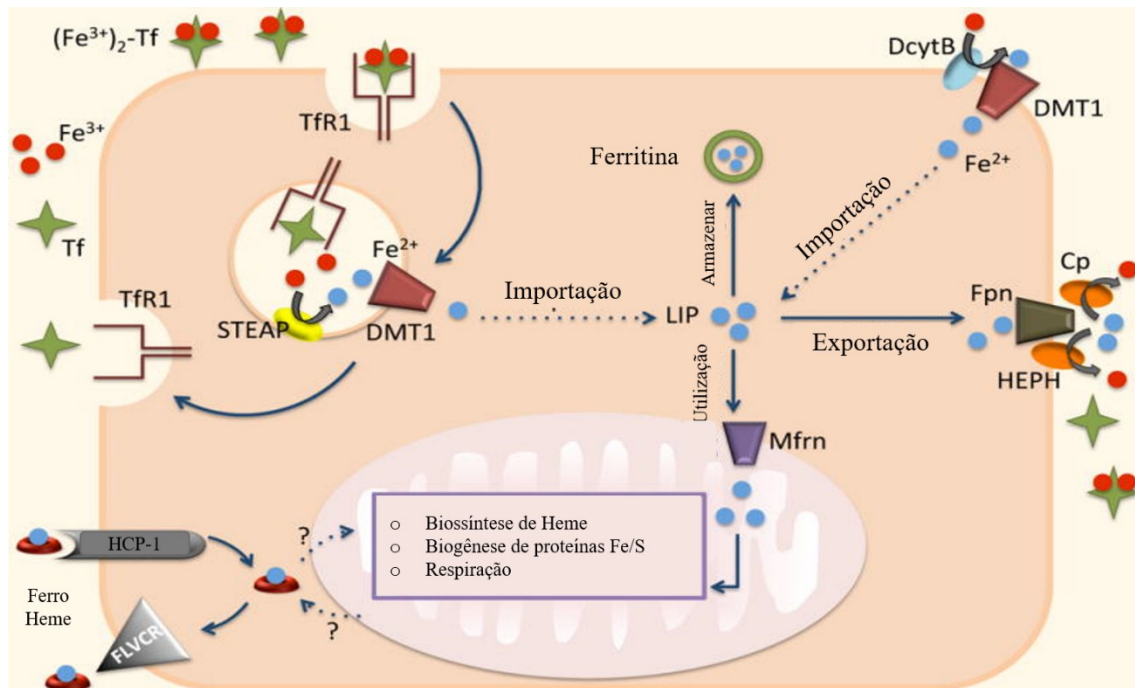


Figura 1. Homeostase do ferro intracelular. A principal forma de entrada do ferro nas células é através do receptor 1 da transferrina (TFR1) através de endocitose, logo após o Fe^{3+} é liberado do complexo Transferrina-TRF1 e reduzido a Fe^{2+} , saindo da vesícula via transportador DMT-1. Segunda forma de entrada de ferro na célula é por meio da redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} pela família transmembrana das metaloredutases (STEAP), e através do transportador DMT-1 o Fe^{2+} adentra a célula. Uma vez no citoplasma da célula, o ferro pode ser armazenado na ferritina, ser utilizado para funções metabólicas, exportado da célula via transportador de ferroportina (Fpn), ou permanecer no citoplasma formando o pool de ferro lábil (LIP). Figura adaptada de CHIFMAN; LAUBENBACHER e TORTI, 2014.

Embora quantidades insuficientes de ferro possam acarretar em doenças, como anemia (NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012), a sobrecarga de ferro no organismo humano (do inglês, *iron-overload*) pode contribuir para o desenvolvimento de doença hepática crônica (KEW, 2014) ou mesmo doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) e de Parkinson (DP) (WARD; ZUCCA; DUYN; CRICHTON *et al.*, 2014). Neste contexto, o pool de ferro lábil (do inglês, *labile iron pool* - LIP) pode ser considerado potencialmente tóxico, pois possui a capacidade de catalisar reações de formação de espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species* - ROS) (GALARIS; BARBOUTI; PANTOPOULOS, 2019). Além de catalisar a formação de radicais livres, o ferro parece ter papel importante na ferroptose por atuar como cofator de LOXs, que catalisam a formação de lipídios oxidados (APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012; LV; WU; WANG; WANG, 2022; PONTIKI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2008).

1.2 FERROPTOSE

A ferroptose (morte celular dependente de Ferro) é uma forma de morte celular regulada e não-apoptótica descrita recentemente, marcada pelo acúmulo de ferro lábil no interior das células, assim como pela oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membranas, densidade condensada da membrana mitocondrial e desaparecimento da crista mitocondrial (DIXON; LEMBERG; LAMPRECHT; SKOUTA *et al.*, 2012; YAGODA; VON RECHENBERG; ZAGANJOR; BAUER *et al.*, 2007). Desta forma, a ferroptose se diferencia bioquimicamente e morfológicamente de outras mortes celulares reguladas, como da apoptose (condensação de cromatina e a redução nuclear) e da necrose (inchaço celular e organelar) (MOUJALLED; STRASSER; LIDDELL, 2021).

Quando ocorre perda da homeostase intracelular relacionada à captação, ao transporte, ao armazenamento e à utilização do Fe^{2+} , pode ocorrer o excesso de ferro lábil intracelular, o qual é altamente reativo de forma a catalisar, por meio da reação de Fenton, a formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (**Figura 2**) (GALARIS; BARBOUTI; PANTOPOULOS, 2019; WINTERBOURN, 1995).

Os radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) formados a partir da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$), são altamente citotóxicos, pois possuem alta reatividade com proteínas, DNA, e são capazes de iniciar a peroxidação de lipídios, característica chave na ferroptose (JIANG; STOCKWELL; CONRAD, 2021; YANG; STOCKWELL, 2016). Isto leva à formação de radicais lipídicos e radicais peroxil lipídicos, especialmente em ácidos graxos poliinsaturados (do inglês, *polyunsaturated fatty acids* - PUFAs) (**Figura 2**) (PEREZ; MAGTANONG; DIXON; WATTS, 2020). Salienta-se que na ferroptose os PUFAs são, preferencialmente, esterificados em fosfolipídios de membrana e, posteriormente, oxidados a peróxidos lipídicos por espécies reativas de oxigênio (ROS) (KAGAN; MAO; QU; ANGELI *et al.*, 2017).

No que se refere às defesas antioxidantes, a glutathione peroxidase 4 (GPx4), enzima que contém selenocisteína e possui glutathione como co-substrato, converte hidroperóxidos lipídicos potencialmente tóxicos em álcoois lipídicos não tóxicos (**Figura 2**) (FORCINA; DIXON, 2019; URSINI; MAIORINO; GREGOLIN, 1985). Tanto níveis baixos de GPx4 quanto sua inibição (induzida por RSL3, inibidor direto da GPx4) resultam em maior peroxidação lipídica e morte celular ferroptótica. Entretanto,

tal fato pode também ocorrer como consequência da depleção de GSH, já que esta molécula antioxidante é co-substrato da GPx4 (IMAI; MATSUOKA; KUMAGAI; SAKAMOTO *et al.*, 2017; URSINI, F.; MAIORINO, M., 2020). A depleção de GSH pode ser induzida com compostos como erastina, um inibidor do sistema Xc- (uma proteína transmembrana que realiza o antiporte de cistina/glutamato) (STOCKWELL; FRIEDMANN ANGELI; BAYIR; BUSH *et al.*, 2017). O sistema xCT (SLC7a11), que representa uma das subunidades do sistema Xc-, é capaz de realizar a importação de cistina na célula, molécula que será posteriormente reduzida à cisteína e, juntamente com o glutamato, servirá como precursor para a síntese de GSH (BASSI; GASOL; MANZONI; PINEDA *et al.*, 2001). A GSH possui afinidade pelo Fe^{2+} , diminuindo o pool de ferro lábil no citosol (HIDER; KONG, 2011). Desta forma, a diminuição desta molécula resulta em aumento da concentração de Fe^{2+} livre, facilitando a reação de Fenton e a peroxidação lipídica, e impactando negativamente a atividade da GPx4 (HIDER; KONG, 2013; LV; SHANG, 2018; YANG; STOCKWELL, 2016).

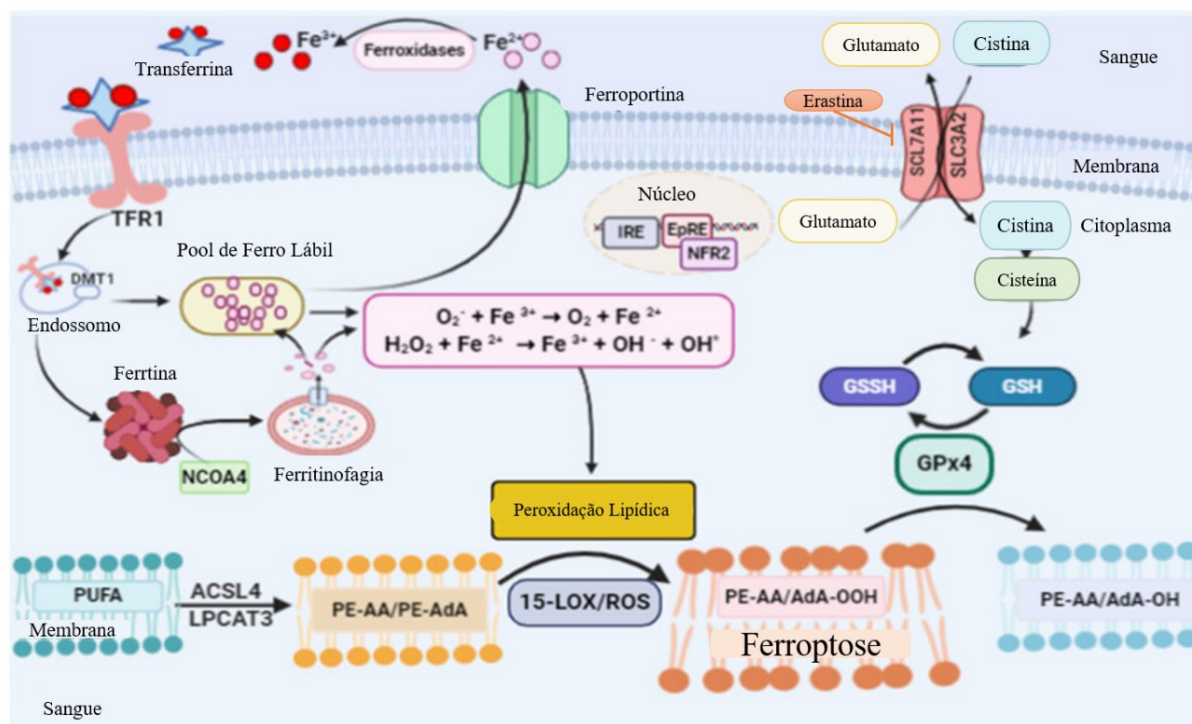


Figura 2. Homeostase do ferro e via da Ferroptose. Primeiramente, ocorre a endocitose da transferrina ligada ao receptor 1 da transferrina (TFR1). Posteriormente, o Fe^{3+} é liberado do complexo Transferrina-TRF1 e reduzido a Fe^{2+} , o qual pode ser armazenado na ferritina ou permanecer no citoplasma formando o pool de ferro lábil (LIP). Através da Reação de Fenton, o Fe^{2+} gera espécies como o radical hidroxila, que reage com os lipídios de membrana, mais especificadamente os PUFAs, proporcionando peroxidação lipídica. Na figura, os exemplos de PUFAs são o ácido araquidônico (AA) ou o ácido adrênico (AdA), levando à ferroptose. A peroxidação lipídica é inibida pela ação da enzima

GPx4, que utilizando a glutationa reduzida (GSH) como substrato, converte PE-AA/AdA-OOH em álcool e água. Na figura também é ilustrado o sistema Xc-, o qual pode ser inibido por erastina, levando à depleção de GSH por falta de seu precursor cistina. Figura adaptada de REICHERT; *et al.*, 2020.

Tendo em vista que a indução da ferroptose está relacionada com a diminuição da atividade (ou dos níveis) de proteínas alvos do gene NRF-2 (do inglês *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2*), que controla a regulação e transcrição de genes que estão envolvidos em processos de detoxificação celular e controle do estresse oxidativo, como por exemplo o sistema xCT e a GPX4, este gene pode ser considerado um regulador negativo da ferroptose (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019).

1.3 ATIVAÇÃO E IMPORTÂNCIA DO GENE NRF-2

NRF-2 é um fator de transcrição que controla tanto a expressão basal de genes sob condições homeostáticas não estressadas quanto a expressão induzível de genes sob perturbação redox (CHANAS; JIANG; MCMAHON; MCWALTER *et al.*, 2002; MCMAHON; ITOH; YAMAMOTO; CHANAS *et al.*, 2001). Este gene regula diretamente, ou indiretamente, vários genes envolvidos em diversas funções celulares que vão desde a citoproteção contra estressores endógenos e ambientais até o metabolismo da GSH, do ferro e de lipídios (HARADA; KANAYAMA; MARUYAMA; YOSHIDA *et al.*, 2011; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA, 2014).

Em condições homeostáticas, a proteína Nrf-2 está presente no citosol da célula, ligada a duas moléculas de Keap-1 (do inglês, *Kelch-like ECH-associated protein 1*), ao domínio Neh2 de Nrf-2 nos motivos ETGE e DLG (através de seu domínio de repetição Kelch) (ITOH; WAKABAYASHI; KATOH; ISHII *et al.*, 1999; TONG; KATOH; KUSUNOKI; ITOH *et al.*, 2006). Keap-1 funciona como uma proteína adaptadora para a ubiquitina ligase Cul3 E3, que é responsável pela ubiquitilação contínua e degradação de Nrf-2 no citosol (WAKABAYASHI; ITOH; WAKABAYASHI; MOTOHASHI *et al.*, 2003).

Quando há um aumento de estresse oxidativo celular, os resíduos de cisteína da Keap-1 modificam-se, perdendo a capacidade de direcionar Nrf-2 à ubiquitinação; desta forma, o Nrf-2 é translocado para o núcleo celular e liga-se à região de elementos de resposta antioxidante (do inglês, *antioxidant response elements - ARE*),

induzindo a expressão de seus genes-alvos e mantendo a homeostase redox (**Figura 3**) (RAGHUNATH; SUNDARRAJ; NAGARAJAN; ARFUSO *et al.*, 2018; URUNO; YAGISHITA; YAMAMOTO, 2015).

A ativação do sistema da Keap1/Nrf-2 (fator de transcrição Nrf-2 - codificado pelo gene NRF-2) através da via dos elementos de resposta antioxidante (ARE), regula a transcrição de genes antioxidantes e de detoxificação como resposta biológica ao estresse oxidativo, regulando negativamente a ferroptose (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019; TU; WANG; LI; LIU *et al.*, 2019).

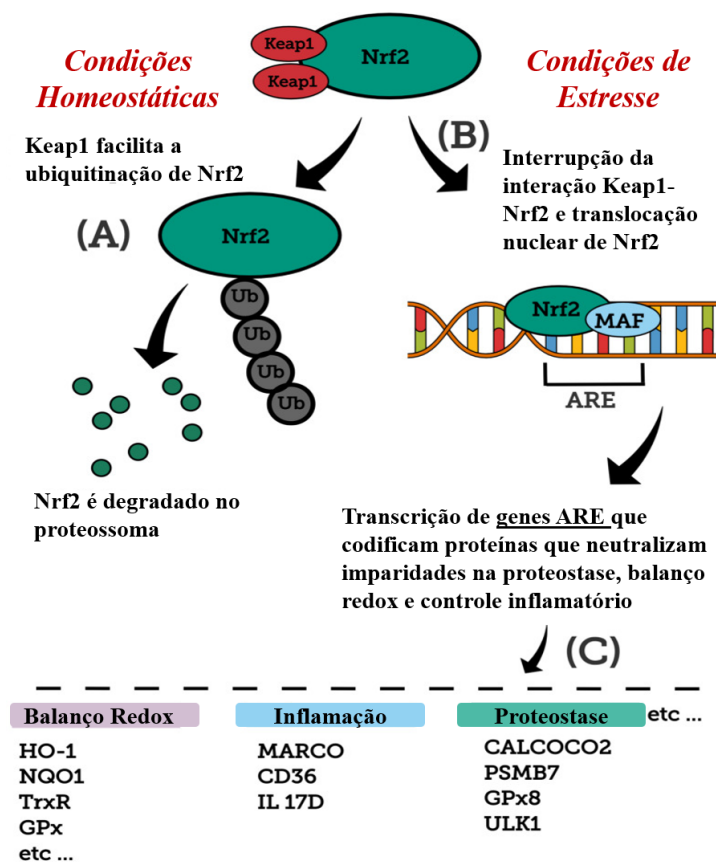


Figura 3. Translocação de Nrf-2 para o núcleo e ativação de genes alvos. Em condições homeostáticas, o Nrf-2 sofre um processo de ubiquitinação e é degradado no proteossoma, porém, quando em condições de estresse, o Nrf-2 deixa de interagir com Keap-1 e é direcionado para o núcleo da célula, onde se liga a região ARE, ocorrendo a transcrição de genes que codificam proteínas para manter o balanço redox, diminuir a inflamação e neutralizar a proteostase. Figura adaptada de FARINA; *et al.*, 2021.

O Nrf-2 pode regular o processo de ferroptose nas células através da modulação da expressão de proteínas responsáveis pelo metabolismo do ferro, como a ferroportina (*SLC40A1*), e a cadeia pesada da ferritina (*FTH1*) (HARADA; KANAYAMA; MARUYAMA; YOSHIDA *et al.*, 2011). Além disso, o Nrf-2 pode ativar a

expressão gênica de uma série de proteínas detoxificantes, como a heme-oxigenase 1 (*HMOX1/HO-1*) – enzima que catalisa a liberação do ferro ligado ao grupo heme –, glutathione peroxidase 4 (*GPx4*) e desidrogenase quinona 1 (*NQO1*), e de proteínas envolvidas na produção da glutathione (GSH), como por exemplo a subunidade *SLC7A11* do sistema xCT, assim como a *GCLM* e *GCLC* subunidades da holoenzima GCL (glutamato-cisteína ligase) que catalisa a reação química L-glutamato + L-cisteína + ATP para formar a GSH (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019; FAN; PAN; ZHU; ZHANG, 2017; FARINA; VIEIRA; BUTTARI; PROFUMO *et al.*, 2021).

1.4 ORGANISMO MODELO *Caenorhabditis elegans*

A utilização do *C. elegans* como modelo experimental é viável, pois possui rápido ciclo de vida, cerca de 25 dias (**Figura 4**), além do pequeno tamanho, a simplicidade e o baixo custo facilitarem o cultivo de *C. elegans* em laboratório (BRENNER, 1974; RIDDLE; BLUMENTHAL; MEYER; PRIESS, 1997). As similaridades dos processos bioquímicos do *C. elegans* com os dos mamíferos fazem com que este nematódeo seja um ótimo organismo modelo de pesquisa (ARTAL-SANZ; DE JONG; TAVERNARAKIS, 2006; LEUNG; WILLIAMS; BENEDETTO; AU *et al.*, 2008). Além disso, estima-se que 60 a 80 % dos genes humanos possuem genes ortólogos no genoma de *C. elegans*, organismo que é amplamente utilizado para estudos relacionados ao estresse oxidativo, sinalização celular, regulação genica, envelhecimento e a toxicologia (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; LEUNG; WILLIAMS; BENEDETTO; AU *et al.*, 2008; MURAKAMI, 2007; RIDDLE; BLUMENTHAL; MEYER; PRIESS, 1997; ZHENG; GREENWAY, 2012).

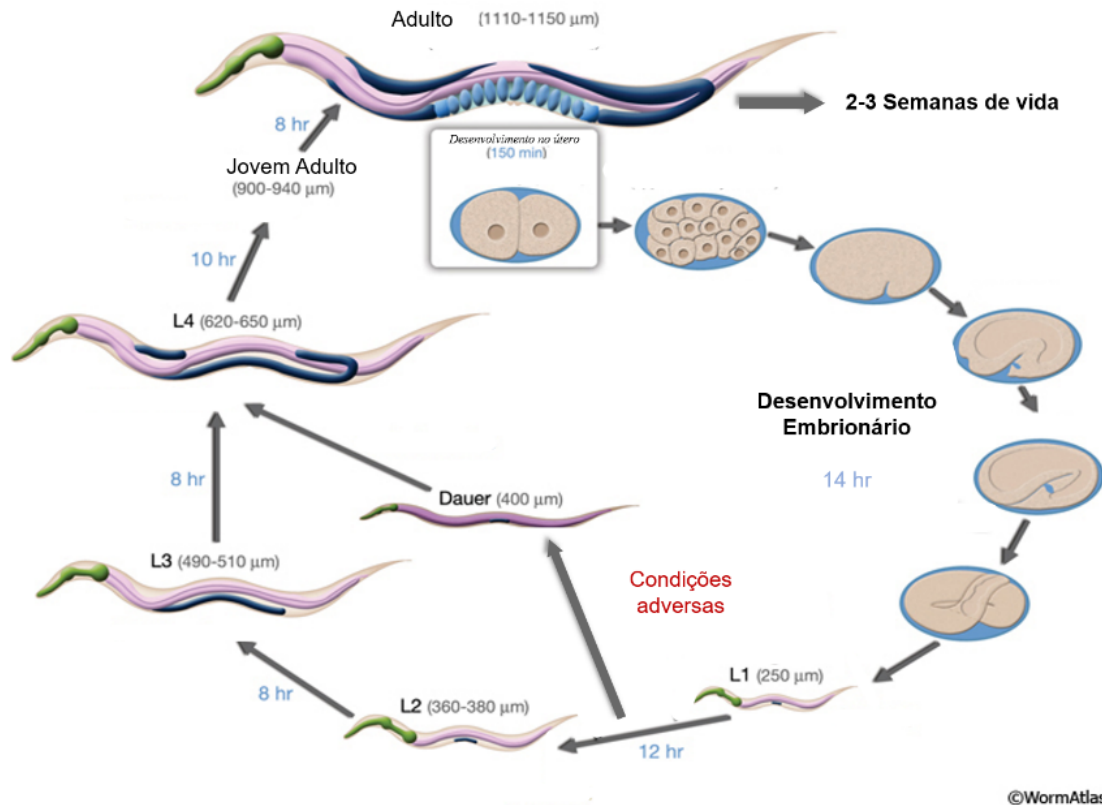


Figura 4. Ciclo de vida de *C. elegans*. O nematoide hermafrodita *C. elegans* possui um primeiro desenvolvimento em fase embrionária, após a eclosão dos ovos, os nematoides possuem diferentes fases larvais (L1, L2, L3 e L4), para então chegar a fase adulta, fase em que ocorre a postura dos ovos, podendo viver mais 2 a 3 semanas. Quando há falta de alimento na fase L1, o nematoide pode entrar na forma dauer, podendo sobreviver até que se encontre em um ambiente com alimento novamente, passando diretamente para a fase L4. Figura adaptada de ALTUN e HALL, 2009.

Devido à facilidade da manipulação gênica, já há diversas cepas nocaute e transgênicas que podem ser adquiridas do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Universidade de Minnesota, EUA). Por serem transparentes, é possível a visualização de estruturas celulares e de transcritos marcados com proteína verde fluorescente (do inglês, *green fluorescent protein* – GFP) no interior do nematoide (CHALFIE; TU; EUSKIRCHEN; WARD *et al.*, 1994; FEINBERG; VANHOVEN; BENDESKY; WANG *et al.*, 2008).

Com o seu ciclo de vida rápido, a fácil manipulação genética, sistemas simples e grande quantidade de genes ortólogos aos mamíferos, o estudo da toxicidade do ferro em *C. elegans* se torna mais facilitada, já que este organismo modelo possui a anatomia intestinal semelhante a de mamíferos (MCGHEE, 2013), fonte de absorção do ferro nos organismos. Além disso, genes importantes para o metabolismo do ferro em *C. elegans* são ortólogos aos dos de mamíferos, como por exemplo o

transportador DMT1 (SMF-3), a ferritina (FTN-1, FTN-2) e a ferroportina (FPN-1.1, FPN-1.2, FPN-1.3) (**Figura 5**) (ANDERSON; LEIBOLD, 2014).

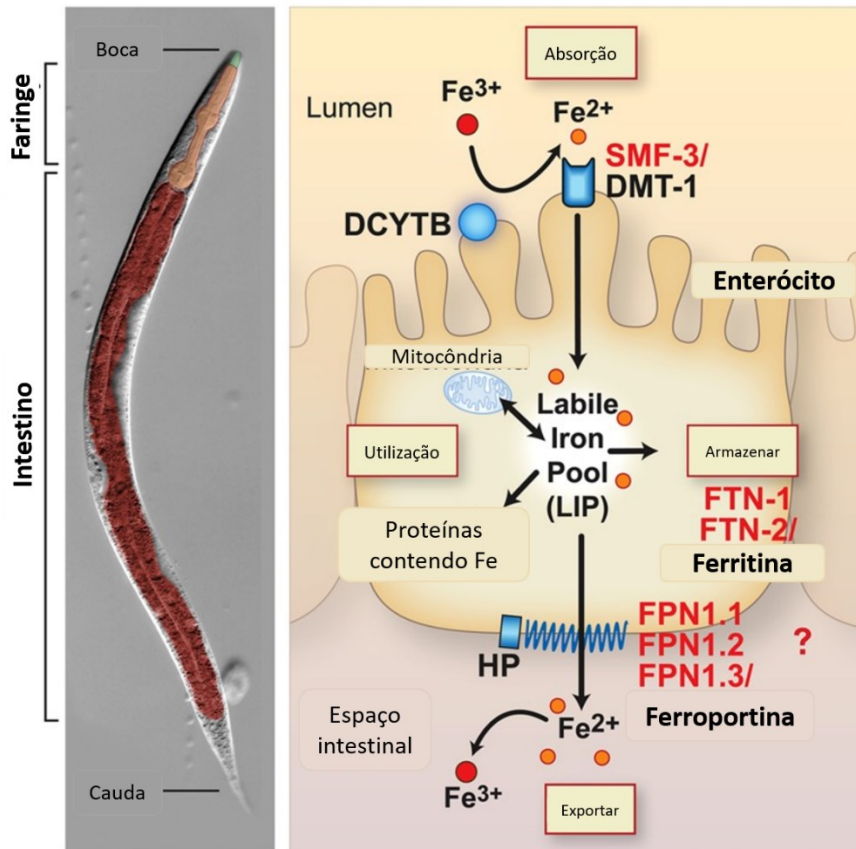


Figura 5: *C. elegans* expressa genes ortólogos aos de mamíferos no metabolismo do ferro. DMT1 (SMF-3), sendo o principal transportador de Fe^{2+} no intestino do *C. elegans*; ferritina (FTN-1, FTN-2) e ferroportina (FPN-1.1, FPN-1.2, FPN-1.3). Fonte: Adaptado de ANDERSON e LEIBOLD, 2014.

Estudos em *C. elegans* têm demonstrado que altos níveis de ferro podem, além de aumentar o estresse oxidativo, diminuir a longevidade do nematoide (KLANG; SCHILLING; SORENSEN; SAHU *et al.*, 2014), além de promover fragilidade no envelhecimento, podendo levar a morte ferroptótica (JENKINS, N. L.; JAMES, S. A.; SALIM, A.; SUMARDY, F. *et al.*, 2020).

Em mamíferos o gene capaz de modular o metabolismo do ferro é o gene NRF-2, que em *C. elegans*, seu gene ortólogo é o gene SKN-1. Neste organismo, a importância de SKN-1 contra danos oxidativos é de igual importância ao NRF-2 em mamíferos, atuando em respostas antioxidantes, funções homeostáticas e de envelhecimento e longevidade (TULLET; GREEN; AU; BENEDETTO *et al.*, 2017). Entretanto, a relação do gene SKN-1 com ferroptose é desconhecida.

1.5 METFORMINA

Estudos mostram que a metformina, um fármaco antidiabético oral pertencente à classe das biguanida, mundialmente utilizado para o tratamento de Diabetes Mellitus tipo II (DM II), vem sendo muito utilizada em *C. elegans* para estudos de longevidade (CABREIRO; AU; LEUNG; VERGARA-IRIGARAY *et al.*, 2013; DE HAES; FROONINCKX; VAN ASSCHE; SMOLDERS *et al.*, 2014; XIAO; LIU; KONG; ZHU *et al.*, 2022). Além disso, há evidências de que a metformina é capaz de modular positivamente o gene SKN-1/NRF-2 (KATILA; BHURTEL; PARK; CHOI, 2021; ONKEN; DRISCOLL, 2010).

A metformina é altamente hidrofílica e, em seres humanos e roedores, seus principais alvos são fígado, intestino e músculo esquelético (FORETZ; VIOLLET, 2014; SANTOMAURO JÚN; UGOLINI; SANTOMAURO; SOUTO, 2008; ZHANG; XU; YU; CHEN, 2019), sendo transportada por transportador catiônico orgânico tipo 1 e 2 (do inglês, *organic cationic transporter* – OCT-1 e OCT-2) (VIOLLET; GUIGAS; SANZ GARCIA; LECLERC *et al.*, 2012; WANG; JONKER; KATO; KUSUHARA *et al.*, 2002). Regulando os níveis de glicemia na célula, a metformina é capaz de ativar a AMPK, tanto em cultivos celulares de hepatócitos humanos (células HepG2), quanto em hepatócitos, em músculo esquelético de ratos (ZANG; ZUCCOLLO; HOU; NAGATA *et al.*, 2004; ZHOU; MYERS; LI; CHEN *et al.*, 2001). A AMPK funciona como um sensor energético celular, diminuindo a relação ATP/AMP em situação de estresse celular, e então inibe vias anabólicas que demandem gasto de ATP, estimulando as vias catabólicas, gerando ATP e recuperando a homeostase energética celular (GRAHAME HARDIE, 2014; YOUNG; LI; BARON; RUSSELL, 2005).

Em relação ao seu mecanismo de ação em humanos, a metformina parece atuar inibindo a gliconeogênese através da inibição do Complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial e levando à ativação da AMPK, reduzindo também a síntese de ácidos graxos, colesterol e lipoproteínas, por meio da fosforilação e consequente inativação da acetil-CoA carboxilase (ACC) (ZHOU; MYERS; LI; CHEN *et al.*, 2001). Consequentemente, contribui para o aumento da oxidação dos ácidos graxos, melhorando a sensibilidade à insulina e diminuindo os níveis de glicose sanguínea (FULLERTON; GALIC; MARCINKO; SIKKEMA *et al.*, 2013). Já no músculo esquelético, a ativação de AMPK resulta na ativação de via de sinalização para

translocação da GLUT-4 para a membrana aumentando a captação de glicose, tanto durante o exercício físico quanto no repouso (MALIN; KASHYAP, 2014; TURBAN; STRETTON; DROUIN; GREEN *et al.*, 2012).

Além da regulação do metabolismo energético regulando a homeostase da glicose em seres humanos, a metformina também parece proteger contra o estresse oxidativo gerado por ROS (BATANDIER; GUIGAS; DETAILLE; EL-MIR *et al.*, 2006), e é capaz de aumentar a longevidade em diferentes organismos modelo, como em camundongos C57BL (*Mus musculus*) e no inseto *D. melanogaster* (MARTIN-MONTALVO; MERCKEN; MITCHELL; PALACIOS *et al.*, 2013; PRYOR; NORVAISAS; MARINOS; BEST *et al.*, 2019). Em *C. elegans*, mostrou-se que a metformina pode aumentar a longevidade dos nematoides jovens via ativação de aak-2 (ortólogo ao AMPK em mamíferos), e conseqüentemente, do gene SKN-1, aumentando as defesas antioxidantes e a resistência ao estresse oxidativo (**Figura 6**) (ESPADA; DAKHOVNIK; CHAUDHARI; MARTIROSYAN *et al.*, 2020; ONKEN; DRISCOLL, 2010).

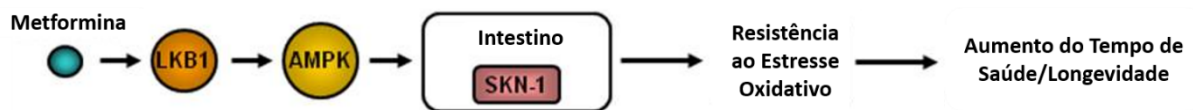


Figura 6: Ativação de SKN-1 pela metformina promovendo aumento da longevidade. LKB1 e AMPK são necessários para os benefícios da metformina para a saúde e a AMPK atua a montante do SKN-1 intestinal para os benefícios da metformina. Figura adaptada de ONKEN e DRISCOLL, 2010.

Desta forma, a metformina pode atuar através de um aumento moderado do estresse oxidativo, ativando defesas compensatórias contra este estresse, e podendo levar a um fenômeno conhecido como mitohormese, onde a resposta biológica para esse aumento de estresse leva a um incremento em mecanismos de defesa, culminando em maior resistência e viabilidade da célula, e/ou aumento da longevidade do organismo (DE HAES; FROONINCKX; VAN ASSCHE; SMOLDERS *et al.*, 2014; SCHULZ; ZARSE; VOIGT; URBAN *et al.*, 2007).

Considerando que (i) o gene Nrf-2 pode modular negativamente a ferroptose em mamíferos através do aumento da expressão de proteínas antioxidantes e/ou relacionadas ao metabolismo do ferro, (ii) o gene SKN-1 em *C. elegans* (ortólogo ao Nrf-2) tem papel benéfico contra diversas condições oxidativas, e que (iii) a metformina foi apontada como uma molécula capaz de ativar Nrf-2/SKN-1 através de um leve

aumento da produção de ROS, ativando a defesa contra o estresse oxidativo, hipotetizamos que a metformina pode prevenir a ferroptose em *C. elegans* através da ativação do gene SKN-1.

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a sobrecarga de ferro (*iron-overload*) caracteriza-se pelo aumento da concentração de ferro livre no organismo. Embora seja razoável hipotetizar que tal sobrecarga leve à morte celular ferroptótica, isto anda não está totalmente esclarecido. Já foi mostrado que a metformina pode modular positivamente a via NRF-2, a qual representa um elemento chave na inibição da ferroptose. Além disso, sabe-se que o gene SKN-1 é ortólogo ao gene NRF-2. Desta forma, parece ser justificável a realização de um estudo para investigar se a metformina pode prevenir a morte celular ferroptótica, através de um pré-estresse energético capaz de ativar a via SKN-1/NRF-2, induzida por uma sobrecarga de ferro em *C. elegans*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar se a metformina protege, via gene SKN-1, contra a ferroptose em um modelo de dano induzido por citrato férrico amoniacal (FAC) em *C. elegans*.

3.2 OBJETIVOS EXPECÍFICOS:

- Padronizar um modelo de *sobrecarga de ferro* (do Inglês, *iron-overload*) baseado na exposição aguda a FAC em *C. elegans*;
- Investigar a importância do gene SKN-1 na defesa de *C. elegans* contra a toxicidade induzida pela exposição aguda a FAC, através do uso das cepas N2 e QV225;
- Medir os níveis de marcadores ferroptóticos (níveis de peroxidação lipídica) em *C. elegans* (cepas N2 e QV225) expostos ao FAC;
- Investigar o possível efeito protetor da metformina sobre a morte induzida por FAC;
- Investigar se o tratamento de *C. elegans* com metformina causa a ativação do gene SKN-1 através do uso das cepas CL2166 e QC224 e da técnica de microscopia de fluorescência.

4. METODOLOGIA

De forma a alcançar o objetivo geral deste projeto, a metodologia foi dividida em quatro fases principais: (I) análise da toxicidade (letalidade) induzida por FAC; (II) análise do possível efeito protetor da metformina contra a toxicidade induzida por FAC; (III) avaliação de marcadores de ferroptose (peroxidação lipídica); e (IV) avaliação do efeito da metformina na expressão da proteína GST-4.

4.1 CEPAS DE *C. elegans*, CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO

As cepas de *C. elegans* utilizadas para os experimentos foram: cepa selvagem (N2); cepa mutante nocaute para SKN-1 (QV225 - *skn-1* (zj15) IV); cepa reporte para GST-4 (CL2166 – *dvl-19* [(pAF15)*gst-4*::GFP::NLS] III); cepa mutante nocaute para SKN-1 e reporte para GST-4 (QV224 - *dvl-19* [(pAF15)*gst-4*::GFP::NLS] III; *skn-1* (zj15) IV).

Para crescimento e reprodução dos vermes, foram utilizadas placas de Petri (100 mm) com o meio de cultivo *nematode growth medium* (NGM) contendo ágar 50 mM; NaCl 50 mM; peptona 20 mg/ml; colesterol 5 µg/mL; CaCl₂ 1 mM; MgSO₄ 1 mM; tampão fosfato e potássio pH 6,0 25 mM; nistatina 12,5 UI/mL; estreptomicina 50 µg/mL. As placas com NGM já solidificado foram recobertas com *Escherichia coli* OP50 vivas (BRENNER, 1974). Para manter o cultivo dos vermes, foi transferido um pedaço de ágar com animais, aproximadamente 1 cm², para uma nova placa de 100 mm com OP50 (procedimento realizado sob condições estéreis, utilizando capela de fluxo laminar). Posteriormente, as placas com os animais foram incubadas na estufa a 20° C.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente foi realizada uma curva de letalidade para avaliação da toxicidade do FAC nos nematoides. Os mesmos foram sincronizados e, após a eclosão dos ovos, colocados em placas NGM de 100 mm com OP50 até atingirem a fase L4, fase larval em que os nematoides foram expostos ao tratamento agudo com FAC (0 mM; 25 mM; 50 mM; 100 mM e 145 mM) (**Figura 7**), conforme descrito no item 4.3. Posteriormente, como primeira estratégia, foi realizada uma curva de letalidade da metformina, de

forma a avaliar a sua toxicidade. Os nematoides sincronizado foram colocados, desde a fase L1 até as 144 h de vida, em placas NGM de 35 mm com OP50 com diferentes concentrações (0, 15, 25, 50 e 100 mM), conforme descrito no item 4.4.1. Para a segunda estratégia de exposição dos nematoides a metformina, esta foi adicionada ao ágar ainda líquido após autoclavar, tendo concentração final de 50 mM de metformina no ágar, para a metformina passasse por possível processão de metabolização pelas bactérias, *E. coli* cepa OP50, conforme descrito no item 4.4.2.

Após a realização da avaliação da toxicidade do FAC, foram escolhidas duas concentrações do composto (50 e 145 mM) para avaliar o possível efeito protetor da metformina sobre a morte induzida por FAC. Os nematoides foram sincronizados e, após a eclosão, colocados em placas contendo ágar NGM suplementado com metformina (concentração final de 50 mM) e OP50, desde a fase L1 até as 144 horas de vida. Posteriormente, na fase L4, os vermes foram tratados com FAC (juntamente ao tratamento com a metformina), tendo como tratamentos experimentais o CTL (100 µl de meio M9), FAC (50 e 145 Mm), Metformina (50 mM), FAC+Metformina. A contagem de sobrevivência foi realizada em 0, 48 e 96 horas após o tratamento com FAC (**Figura 7**), conforme descrito no item 4.4.2. O mesmo foi realizado para as diferentes concentrações de metformina (0, 15, 25 e 50 mM), conforme descrito no item 4.4.1.

Para avaliação de marcador ferroptótico, os nematoides foram sincronizados e, após a eclosão, tratados pré-tratados e tratados com os grupos já mencionados. Após 48 h de tratamento com FAC, os nematoides foram lavamos em tampão M9 e incubados com a sonda fluorescente C11 BODIPY 581/591 (10 µM em M9), para a identificação de peroxidação lipídica; posteriormente foram anestesiados com levamisol (10 mM) em almofadas de agarose, e analisados em um microscópio confocal Leica DMI6000 B (**Figura 7**), conforme descrito item 4.5.

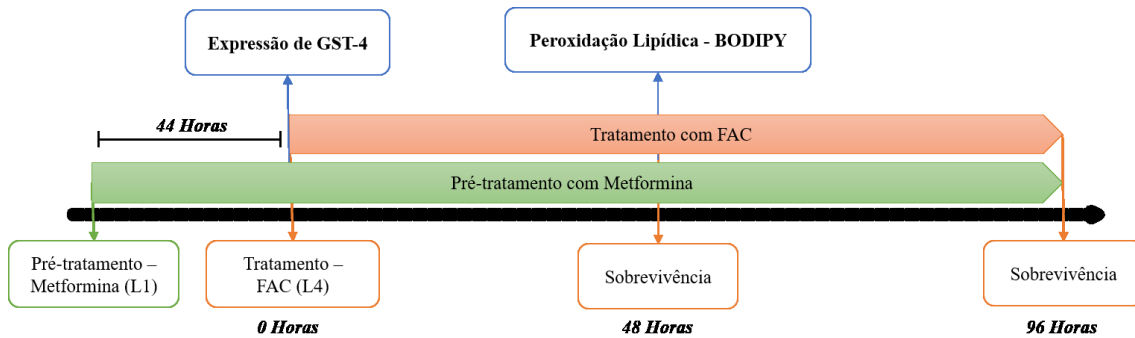


Figura 7: Delineamento experimental. Pré-tratamento com metformina da fase L1 do *C. elegans* até o fim da curva de sobrevivência (incluindo a curva de letalidade da metformina). Os tratamentos com FAC foram realizados quando os nematoides atingirem a fase L4 (0 h) (incluindo a curva de letalidade do FAC) e a sobrevivência foi contada em 48 e 96 h. As análises de microscopia foram realizadas na fase L4, para observar a expressão de GST-4, e 48 h após L4, para a avaliação da peroxidação lipídica.

Por fim, os nematoides (cepas CL2166 e QV224) foram utilizados para investigar a presença do gene SKN-1 pela ativação da GST-4 através da exposição a metformina. Para isso, os nematoides foram sincronizados e, após a eclosão, colocados em placas com ágar NGM contendo metformina (50 mM) e OP50. Quando os nematoides atingiram a fase L4, foram coletados das placas e lavados 3 vezes com tampão M9, posteriormente foram anestesiados com levamisol (10 mM) em almofadas de agarose, e as imagens de microscopia foram adquiridas utilizando o microscópio Olympus BX41 (**Figura 7**), conforme descrito item 4.6.

4.3 CURVA DE LETALIDADE - FAC (MODELO *IRON-OVERLOAD*)

A toxicidade mediada pelo ferro foi induzida pelo tratamento de nematoides com citrato férrico amoniacal (FAC) (KLANG; SCHILLING; SORENSEN; SAHU *et al.*, 2014). Os nematoides das cepas N2 e QV225 foram sincronizados e, quando atingiram a fase L4, foram expostos (25 a 30 vermes) a diferentes concentrações de FAC (0 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM e 145 mM) em placas de 35 mm durante 96 horas. Em 0, 48 e 96 horas após os tratamentos, conforme protocolo já definido pelo grupo de pesquisa (dados ainda não publicados); os vermes sobreviventes foram contados com auxílio de uma lupa e a dose letal 50% (DL50) foi calculada com base na curva de sobrevivida dose-resposta. Vermes sem movimento ou reação a estímulos suaves foram classificados como mortos. Todos os tratamentos foram realizados em

triplicata e os experimentos foram repetidos, de forma independentemente, cinco vezes.

4.4 EXPOSIÇÃO E POSSÍVEL PROTEÇÃO DA METFORMINA

4.4.1 Exposição direta do *C. elegans* à metformina

Vermes em estágio L1 foram expostos diretamente a concentrações crescentes de metformina, sendo avaliada a possível toxicidade da mesma. Para a exposição direta dos nematoides a metformina, placas com ágar NGM padrão e com bactéria OP50 foram preparadas previamente; nos dias dos experimentos a metformina era adicionada na placa, por cima da bactéria, e em seguida os nematoides eram transferidos para as placas com metformina.

Primeiramente, os nematoides foram sincronizados e, após a eclosão dos ovos, estes foram lavados três vezes com tampão M9 (KH₂PO₄ 22 mM; Na₂HPO₄ 42 mM; NaCl 86 mM; MgSO₄ 1M) através de centrifugações (dois minutos cada, 1699 x g a 20°C) em tubos cônicos tipo falcon de 15 ml. Os nematoides em estágio L1 (25 a 30 vermes) foram expostos a diferentes concentrações de metformina (0 mM, 15 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM) até as 144 horas de vida, após L1, em placas de 35 mm com OP50. Em 0, 48, 96, e 144 horas, os vermes sobreviventes foram contados.

Os nematoides foram pré-tratados com metformina desde a fase L1, quando atingiram a fase larvar L4 foram lavados com M9, e destes, cerca de 25 a 30 nematoides foram transferidos para suas respectivas placas (35 mm) (triplicatas) e submetidos aos tratamentos experimentais: CTL (100 µl de meio M9), FAC, Metformina, FAC+Metformina. A taxa de sobrevivência foi analisada nos tempos 0 horas (fase L4), 48 e 96 horas após a fase L4 e ao tratamento com FAC. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e os experimentos foram repetidos independentemente pelo menos quatro vezes.

4.4.2 Suplementação do ágar com metformina

As placas foram suplementadas com metformina, tendo uma concentração final de 50 mM no ágar (CABREIRO, *et al.*, 2013). Primeiramente, foi realizada a

autoclavagem do ágar NGM e, posteriormente, foi adicionada a metformina (100 mg/mL mãe 2,11 M) diluída em tampão M9 ao meio NGM líquido. Para os grupos controle, foi adicionado apenas tampão M9 ao meio NGM líquido. Placas de Petri contendo ágar NGM suplementado ou não com metformina foram secas à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, foram semeadas com *E. coli* OP50, ficando dois dias em estufa a 37° C para o crescimento da bactéria.

Dois dias após a adição de OP50 às placas, larvas sincronizadas L1 foram transferidas para estas (média de 2.000 nematoides em cada placa de Petri de 60 mm com OP50). Quando atingiram a fase L4, os nematoides foram transferidos para Placas de Petri de 35 mm, contendo 3 mL de ágar NGM suplementado, ou não, com metformina, juntamente com o tratamento com FAC (50 e 145 mM). A taxa de sobrevivência foi avaliada após 48 e 96 h da fase L4 e todos os tratamentos foram realizados em triplicata e os experimentos foram repetidos, de forma independentemente, quatro vezes.

4.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA - C11 BODIPY 581/591

Para visualizar a taxa da peroxidação lipídica, foi utilizada a técnica de microscopia confocal, conforme já protocolado pelo grupo de pesquisa (dados não publicados). Os vermes foram tratados conforme descrito nos itens anteriores e, 48 h após a fase L4, 30 vermes foram coletados, lavados três vezes com tampão M9 e transferidos para uma solução de C11 BODIPY 581/591 (10 µM em M9) e incubados por 1 h para incorporação da sonda fluorescente (HOW *et al.*, 2018; HOW *et al.*, 2019). Após a marcação, os vermes foram novamente lavados três vezes com M9, ressuspensos em 100 µL de M9, anestesiados com 10 mM levamisol em almofadas de agarose a 2%, e analisados em um microscópio confocal Leica DMI6000 B acoplado a um scanner confocal TCS SP5. As imagens foram capturadas em objetiva 20x / 0,70 e BODIPY581-591-C11 oxidado foi lido em 488 nm (excitação) e 543 nm (emissão), e o não-oxidado em 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão). Para a análise dos dados, foi utilizado o software ImageJ, e o índice de peroxidação lipídica foi calculado usando a seguinte proporção: [fluorescência verde/fluorescência total (verde + vermelha)].

4.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

A técnica de microscopia confocal também foi utilizada para avaliar a expressão da enzima glutathiona-S-transferase (GST-4). Esta enzima é um clássico alvo *downstream* cujo aumento da expressão proteica depende da ativação do gene SKN-1. Neste sentido, foi investigado o efeito do tratamento com metformina na expressão proteica (medida através da quantificação da fluorescência) em cepas CL2166 e QV224.

Após a eclosão, os nematoides foram transferidos para placas de 35 mm (triplicatas) contendo ágar NGM suplementado, ou não, com metformina (50 mM) (CABREIRO, *et al.*, 2013). Para grupo de controle positivo da expressão de GST-4, nematoides L3 foram expostos por 14 - 15 h a t-BHQ (Terc Butil Hidroquinona) 2 mM. Quando os nematoides atingiram o estágio L4, 30 animais de cada grupo foram coletados e lavados três vezes com tampão M9, posteriormente, foram ressuspensos em 100 µL de M9, anestesiados com levamisol 10 mM em almofadas de agarose a 2% e analisados. As imagens de microscopia foram adquiridas utilizando o microscópio Olympus BX41, utilizando a onda de fluorescência verde, e quantificadas pelo software ImaeJ.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos e análises estatísticas foram realizados com a utilização do programa GraphPad Prism 8.0. Primeiramente foram realizados testes de normalidade para avaliar se os dados foram paramétricos, e após utilizamos o teste de Grubbs para detecção de possíveis outliers. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student e as taxas de letalidade foram comparadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett. Os demais dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os resultados foram representados como média +/- desvio padrão (S.D.) e considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 MODELO DE *IRON-OVERLOAD* INDUZ MORTALIDADE EM *C. elegans*.

O excesso de ferro intracelular é um evento primário que leva a danos nos órgãos em pacientes com sobrecarga de ferro. Para investigar o dano mediado pela sobrecarga de ferro, primeiro desenvolveu-se um modelo *in vivo* baseado na exposição ao citrato de amônio férrico (FAC) em *C. elegans*. Em animais do tipo selvagem (cepa N2), a exposição ao FAC causou mortalidade dependente da concentração no tempo de 96 h (**Figura 8 B**), embora não tenham sido observadas alterações significativas na taxa de mortalidade após 48 h de exposição, com exceção da maior concentração testada (145 mM) (**Figura 8A**).

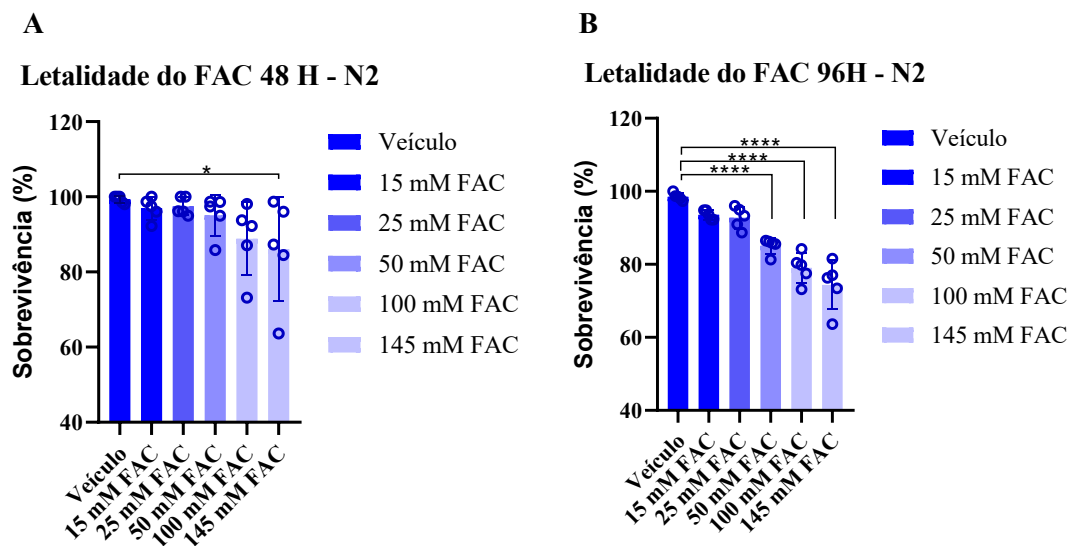


Figura 8: Modelo de *Iron-overload* induz mortalidade em *C. elegans*. Os nematoides da cepa N2 (selvagem) foram tratados com diferentes concentrações de FAC (0, 15, 25, 50, 100 e 145 mM) a partir da fase L4, e a sobrevivência dos mesmos foi contada no tempo de 48 h (**A**) e 96 h (**B**) após L4. A taxa de sobrevivência é apresentada como % do número inicial de animais vivos (~25/experimento/grupo). Os dados são representados como média +/- SD (N = 3). * p < 0,05, **** p < 0,0001 em comparação com o respectivo controle após ANOVA de um fator seguida do teste de Dunnett.

5.2 METFORMINA NÃO PROTEGE DA MORTALIDADE INDUZIDA POR UM MODELO DE *IRON-OVERLOAD* EM *C. elegans*.

Já é de conhecimento na literatura que a metformina é capaz de aumentar a longevidade em *C. elegans* (CABREIRO; AU; LEUNG; VERGARA-IRIGARAY *et al.*, 2013; DE HAES; FROONINCKX; VAN ASSCHE; SMOLDERS *et al.*, 2014; XIAO; LIU;

KONG; ZHU *et al.*, 2022). Considerando a relação da ferroptose com fragilidade e envelhecimento (JENKINS, NICOLE L.; JAMES, SIMON A.; SALIM, AGUS; SUMARDY, FRANSISCA *et al.*, 2020), avaliou-se se ela é capaz de proteger contra a morte induzida por *iron-overload*. Primeiramente, foi observado o efeito concentração-dependente da metformina sobre a taxa de mortalidade (durante 144 h a partir da fase L1) de forma a investigar se o composto pode induzir mortalidade ao *C. elegans*. Observou-se que concentrações altas de metformina podem ser tóxicas ao *C. elegans*, causando mortalidade (**Figura 9 A-C**).

Posteriormente, avaliou-se se as concentrações de metformina que não foram tóxicas protegeriam da mortalidade induzida pelo modelo de *iron-overload*, através da exposição ao FAC (50 e 145 mM), em *C. elegans* do tipo selvagem (cepa N2). Observou-se que não ocorreu proteção significativa induzida pela metformina, tanto no tempo de 48 h quanto em 96 h (**Figura 9 D-E**). Esses resultados demonstram que a exposição direta à metformina, quando em altas concentrações, pode ser tóxica aos nematoides. Além disso, em concentrações aparentemente atóxicas, a metformina não consegue proteger contra a mortalidade induzida pelo modelo de *iron-overload*.

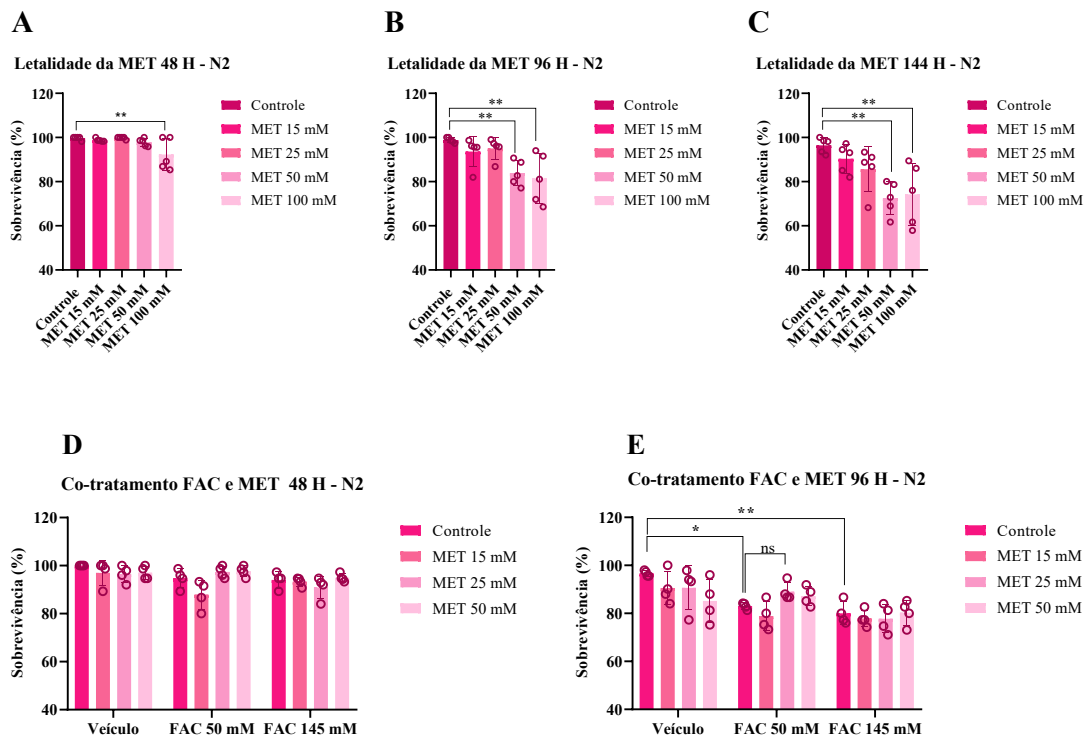


Figura 9: Metformina não protege da mortalidade induzida por um modelo de *iron-overload* em *C. elegans*. (A-C) Curva de letalidade - Nematoides do tipo selvagem (cepa N2) foram colocados em placas contendo diferentes concentrações de metformina (0, 15, 25, 50 e 100 mM), desde a fase L1 até as 144 h de vida. A sobrevivência foi contada nos tempos de 48 h (A), 96 h (B) e 144 h (C). (D-E)

Curvas de sobrevivência – nematoides (cepa N2) foram pré-tratados desde a fase L1 com diferentes concentrações de metformina (0, 15, 25 e 50 mM), e no estágio L4, os nematoides foram expostos a 50 ou 145 mM de FAC durante 48 (D) ou 96 h (E). A taxa de sobrevivência é apresentada como % do número inicial de animais vivos (~25/experimento/grupo). Os dados são representados como média +/- SD (N = 3). ns = não significativo, * p < 0,05 e ** p < 0,001 em comparação com o respectivo controle após ANOVA one-way seguida do teste de Dunnett (A-C) e ANOVA de dois fatores seguida do teste de Newman-Keuls (D-E).

5.3 A METFORMINA DEPENDE DA METABOLIZAÇÃO BACTERIANA PARA PROTEGER CONTRA A MORTALIDADE INDUZIDA POR UM MODELO DE *IRON-OVERLOAD* EM *C. elegans*.

Segundo Cabreiro *et al.*, 2013, a metformina precisa ser metabolizada pelas bactérias que são consumidas pelos *C. elegans* para que possa aumentar a longevidade (CABREIRO; AU; LEUNG; VERGARA-IRIGARAY *et al.*, 2013). Desta forma, decidiu-se testar se a metformina consegue proteger contra a mortalidade induzida pelo modelo de *iron-overload* em *C. elegans*, através de sua metabolização pelas bactérias *Escherichia coli* (cepa OP50). A metformina foi adicionada ao ágar NGM (concentração final de 50 mM) e, no dia seguinte, adicionou-se OP50 nas placas contendo o ágar suplementado e as placas foram incubadas durante dois dias a 37°C para o crescimento do tapete bacteriano.

Os nematoides foram expostos desde a fase L1 em placas com o ágar suplementado com metformina 50 mM e, quando atingiram a fase L4, foram expostos ao modelo de *iron-overload*, através da exposição ao FAC (50 e 145 mM), com ou sem metformina. A taxa sobrevivência foi avaliada em 48 e 96 h após a exposição ao FAC. No tempo de 48 h após a exposição os FAC, houve um pequeno (porém significativo) aumento na taxa de mortalidade induzido pelo FAC (50 mM) (**Figura 10 A**). Já no tempo de 96 h após a exposição ao FAC, observou-se que a metformina 50 mM foi capaz de proteger da morte induzida pelo modelo de *iron-overload*, em ambas as concentrações de FAC utilizadas (**Figura 10 B**). Esses resultados demonstram que a metformina precisa ser metabolizada para que ocorra a proteção contra a morte induzida pelo modelo de *iron-overload*.

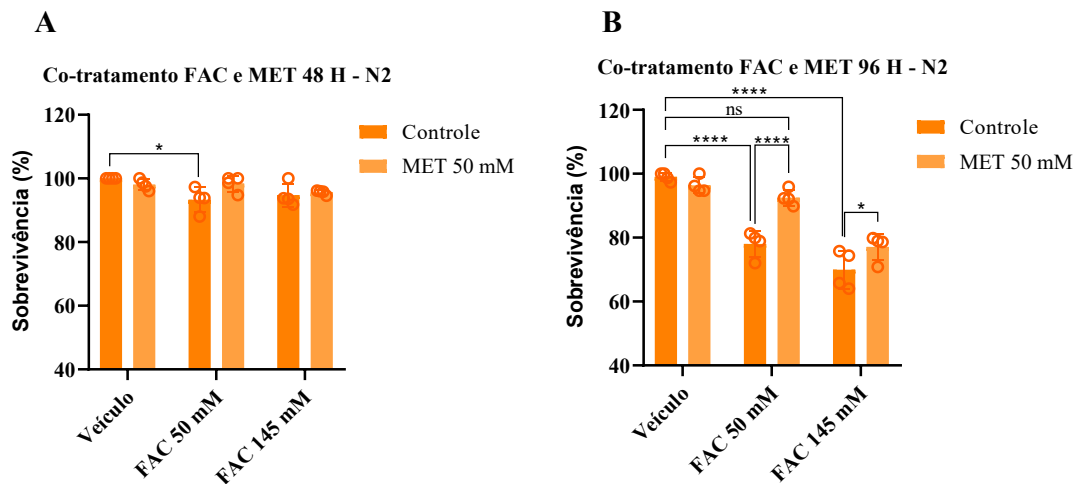
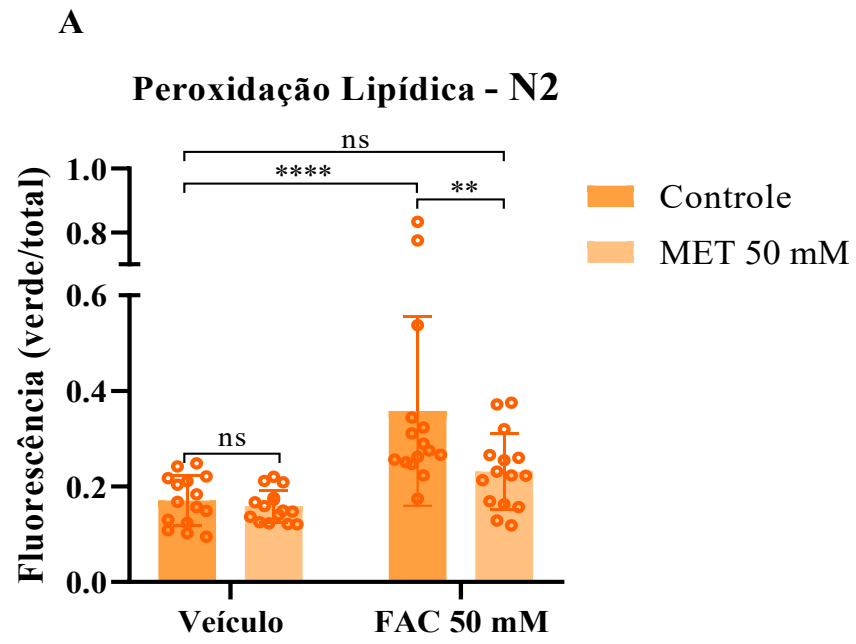


Figura 10: A metformina depende da metabolização bacteriana para proteger da mortalidade induzida por um modelo de *iron-overload* em *C. elegans*. Nematoides do tipo selvagem (cepa N2), a partir de L1, foram expostos a Metformina (MET 50 mM). No estágio L4, os nematoides foram expostos a 50 ou 145 mM de FAC durante 48 (A) ou 96 h (B). A taxa de sobrevivência é apresentada como % do número inicial de animais vivos (~25/experimento/grupo). Os dados são representados como média +/- SD (N = 3). ns = não significativo, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ em comparação com o respectivo controle após ANOVA two-way seguida do teste de Newman-Keuls.

5.4 A METFORMINA DIMINUI A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA POR UM MODELO DE *IRON-OVERLOAD* EM *C. elegans*.

Além da proteção contra mortalidade induzida por *iron overload*, avaliou-se se a metformina é capaz de proteger contra a peroxidação lipídica, evento crucial da ferroptose, a qual é oriunda de uma sobrecarga de ferro nas células. Os resultados demonstram que, em *C. elegans* do tipo selvagem (cepa N2), ocorreu aumento da peroxidação lipídica nos animais que foram expostos ao modelo de *iron-overload* utilizando o FAC (50 mM durante 48 h). No entanto, em nematoides L1 incubados em placas previamente tratadas com 50 mM metformina e OP50, observou-se proteção contra a peroxidação lipídica induzida pelo FAC (50 mM) (Figura 11 A-B). Esses resultados demonstram a ocorrência de peroxidação lipídica induzida por 50 mM FAC em um momento que precede a morte (Figura 8A) e que a metabolização da metformina pelas bactérias OP50 protege da peroxidação lipídica induzida pelo modelo de *iron-overload* em *C. elegans*.



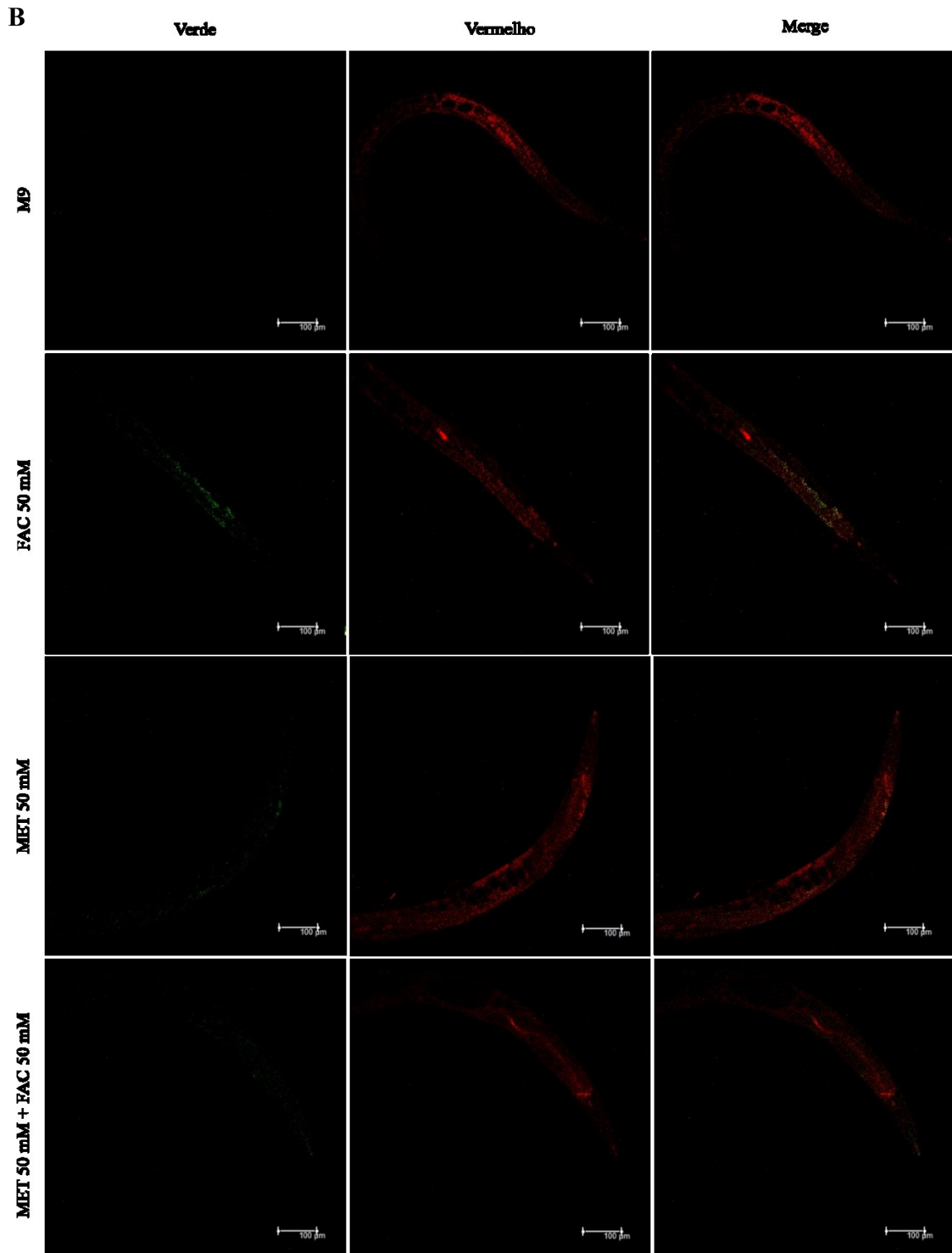


Figura 11: Metformina diminui a peroxidação lipídica induzida por um modelo de *iron-overload* em *C. elegans*. (A) Nematoides do tipo selvagem (cepa N2) foram expostos a veículo ou 50 mM de metformina partir de L1. No estágio L4, os vermes foram expostos a 50 mM FAC durante 48 h. A peroxidação lipídica (coloração BODIPY-C11) é apresentada como fluorescência [verde/total (verde + vermelho)]. ns = não significativo; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dois fatores seguida do teste de Newman-Keuls. N = 15 vermes por grupo (derivado de 3 experimentos independentes). (B) Imagens de microscopia confocal representativas de fluorescência BODIPY-C11 vermelha e verde de um (i) controle, (ii) FAC (50 mM), (iii) metformina (50 mM) e (iv) FAC (50 mM) + metformina (50 mM) - 48 h após a exposição FAC.

5.5 MODELO DE *IRON-OVERLOAD* INDUZ MORTALIDADE EM *C. elegans* NOCAUTES PARA O GENE SKN-1.

Onken e Driscoll, 2010, observaram que a metformina ativa o gene SKN-1, ortólogo ao gene NRF-2 dos mamíferos, aumentando a longevidade de *C. elegans*. Desta forma, foram verificar se a metformina (através da sua metabolização pelas bactérias) protegeria contra a mortalidade induzida pelo FAC em nematoides nocautes para SKN-1.

Para investigar o dano mediado pela sobrecarga de ferro, os nematoides nocautes para o gene SKN-1 (cepa QV225) foram expostos ao citrato de amônio férrico (FAC). Após 96 h de exposição ao FAC, foi observado um aumento na taxa de mortalidade dependente da concentração (**Figura 12 B**), embora não tenham sido observadas alterações significativas na taxa de mortalidade às 48 h, com exceção da maior concentração testada (145 mM) (**Figura 12 A**), de forma similar à cepa selvagem N2 (**Figura 8A**).

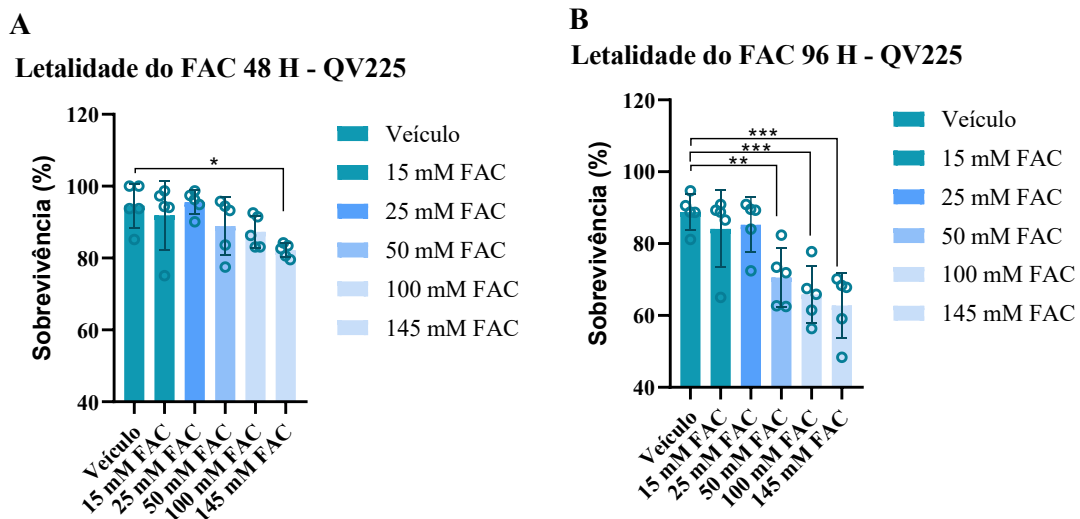


Figura 12: Modelo de *Iron-overload* induz mortalidade em *C. elegans* nocautes para o gene SKN-1. Os nematoides da cepa nocaute para o gene SKN-1 (QV225) foram tratados com diferentes concentrações de FAC (0, 15, 25, 50, 100 e 145 mM) a partir da fase L4, e a sobrevivência dos mesmos foi contada no tempo de 48 h (**A**) e 96 h (**B**) após L4. A taxa de sobrevivência é apresentada como % do número inicial de animais vivos (~25/experimento/grupo). Os dados são representados como média +/- SD (N = 3). * p < 0,05, ** p < 0,001 e *** p < 0,0005 em comparação com o respectivo controle após ANOVA de um fator seguida do teste de Dunnett.

5.6 A METFORMINA NÃO PROTEGE DA MORTALIDADE INDUZIDA PELO MODELO DE *IRON-OVERLOAD* EM *C. elegans* NOCAUTES PARA O GENE SKN-1.

Os nematoides nocautes para o gene SKN-1 (cepa QV225) foram expostos desde a fase L1 em placas com o ágar suplementado com metformina 50 mM (com OP50, as quais foram deixadas á 37°C durante dois dias antes da realização de cada experimento), e quando atingiram a fase L4 foram expostos ao modelo de *iron-overload*, através da exposição ao FAC (50 e 145 mM), com ou sem metformina, e a sobrevivência foi contada. No tempo de 96 h após a exposição ao FAC, observou-se que a metformina 50 mM não foi capaz de proteger da morte induzida pelo modelo de *iron-overload*, em ambas as concentrações de FAC utilizadas (**Figura 13 A-B**), ao contrário da cepa selvagem (N2) (**Figura 10 A-B**). Esses resultados demonstram que a proteção da metformina (após metabolismo bacteriano) contra a morte induzida pelo modelo de *iron-overload* parece depender da ativação do gene SKN-1 em *C. elegans*.

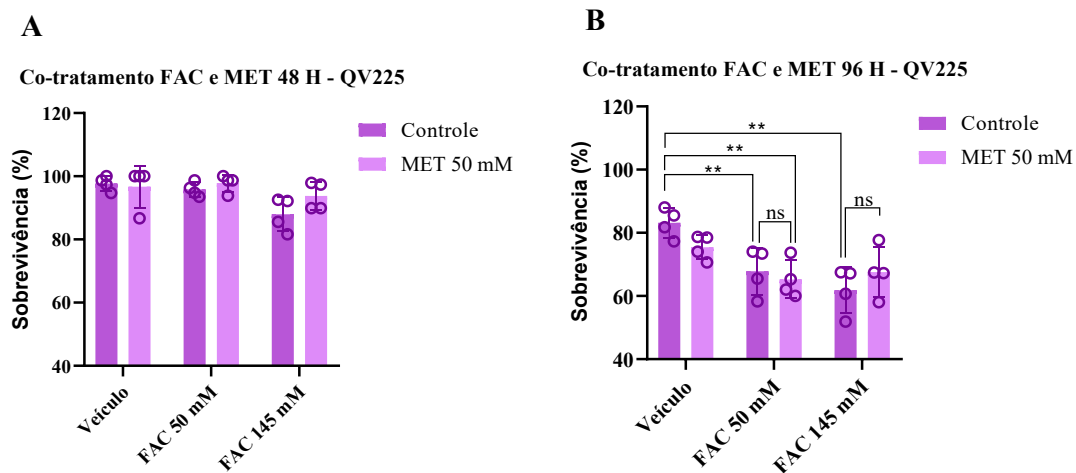
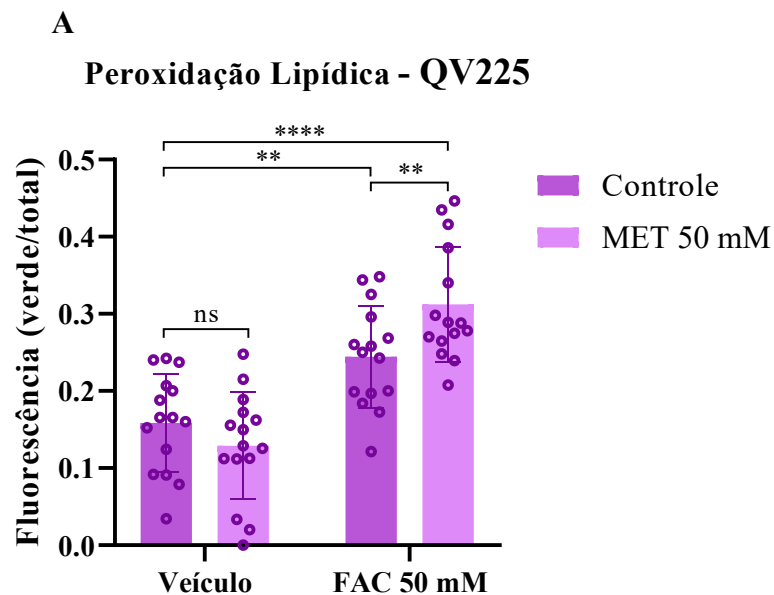


Figura 13: A metformina não protege da mortalidade induzida pelo modelo de *iron-overload* em *C. elegans* nocautes para o gene SKN-1. Nematoides nocautes para o gene SKN-1 (cepa QV225), a partir de L1, foram expostos a Metformina (MET 50 mM). No estágio L4, os nematoides foram expostos a 50 ou 145 mM de FAC durante 48 (**A**) ou 96 h (**B**). A taxa de sobrevivência é apresentada como % do número inicial de animais vivos (~25/experimento/grupo). Os dados são representados como média +/- SD (N = 3). ns = não significativo e ** p < 0,001 em comparação com o respectivo controle após ANOVA de dois fatores seguida do teste de Newman-Keuls.

5.7 A METFORMINA NÃO PROTEGE CONTRA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA POR UM MODELO DE *IRON-OVERLOAD* EM *C. elegans* NOCAUTES PARA O GENE SKN-1.

Por não observar proteção da metformina contra a mortalidade induzida pelo modelo de *iron-overload* em nematoides nocautes para o gene SKN-1 (cepa QV225), avaliou-se se a metformina dependia da ativação do gene SKN-1 para proteger contra a peroxidação lipídica induzida por FAC. Os resultados demonstram que, em *C. elegans* nocautes (cepa QV225), ocorreu aumento da peroxidação lipídica nos animais que foram expostos ao modelo de *iron-overload* utilizando o FAC (50 mM). No entanto, nematoides que foram tratados com FAC, mas foram expostos a placas com ágar suplementado com metformina (50 mM), e OP50, desde a fase L1, não observou-se proteção significativa contra a peroxidação lipídica induzida pelo FAC (50 mM) (**Figura 14 A-B**), diferentemente da cepa selvagem (N2) (**Figura 11 A-B**). Esses resultados demonstram que a proteção induzida por metformina (após metabolismo bacteriano) contra a peroxidação lipídica induzida pelo modelo de *iron-overload* em *C. elegans* parece depender da ativação do gene SKN-1.



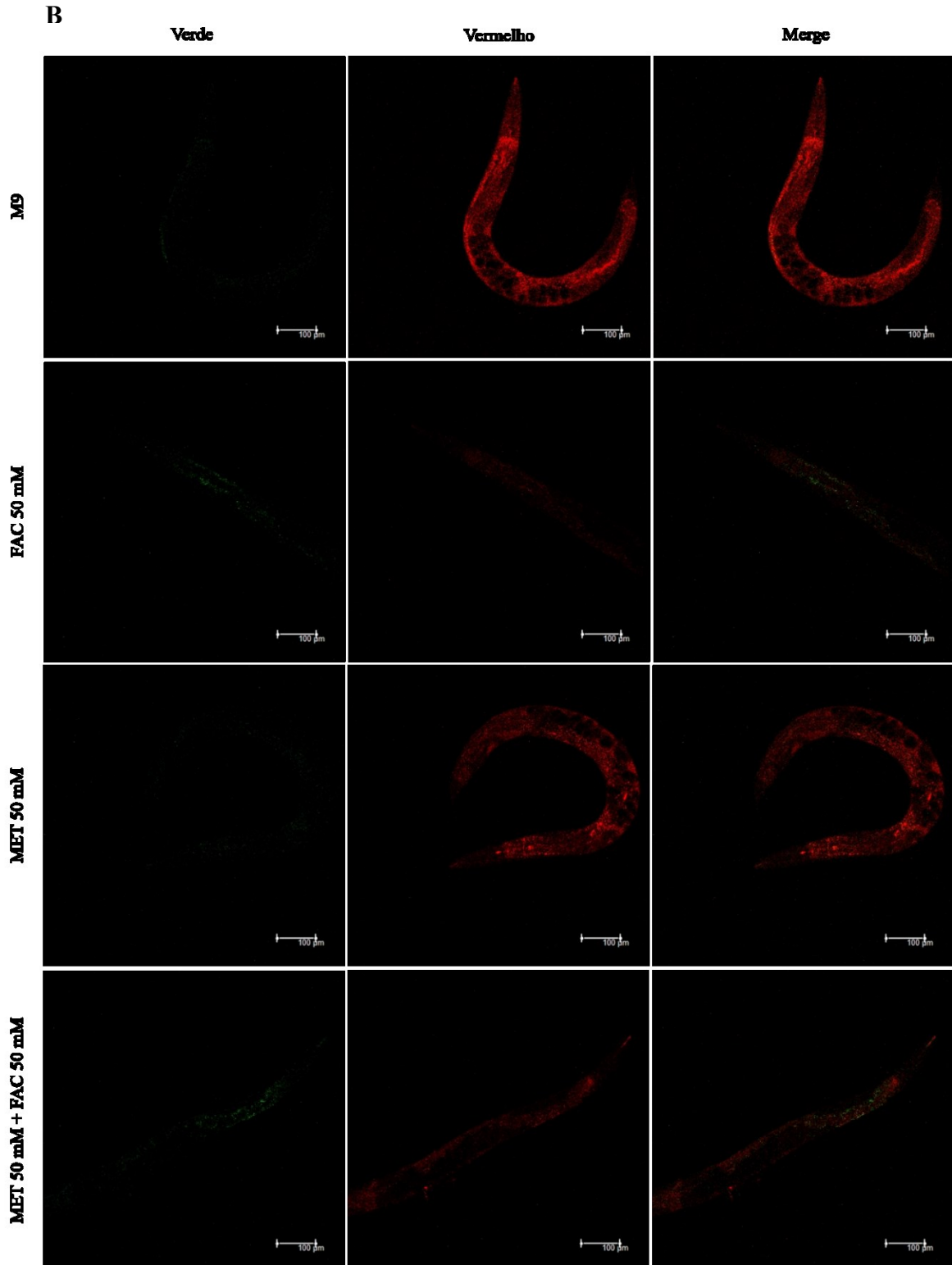
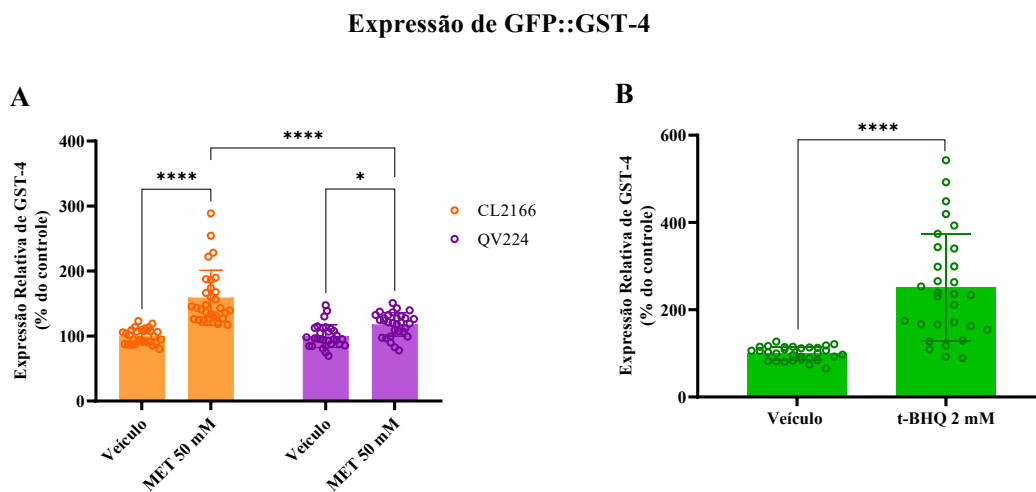


Figura 14: A metformina não protege contra a peroxidação lipídica induzida por um modelo de *iron-overload* em *C. elegans* nocautes para o gene *SKN-1*. **(A)** Nematoides nocautes para o gene *SKN-1* (cepa QV225) foram expostos a veículo ou 50 mM de metformina partir de L1. No estágio L4, os vermes foram expostos a 50 mM FAC durante 48 h. A peroxidação lipídica (coloração BODIPY-C11) é apresentada como fluorescência [verde/(verde + vermelho)]. ns = não significativo; ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dois fatores seguida do teste de Newman-Keuls. N = 15 vermes por grupo (derivado de 3 experimentos independentes). **(B)** Imagens de microscopia confocal representativas de fluorescência BODIPY-C11 vermelha e verde de um (i) controle, (ii) FAC (50 mM), (iii) metformina (50 mM) e (iv) FAC (50 mM) + metformina (50 mM) - 48 h após a exposição FAC.

5.8 A METFORMINA AUMENTA A EXPRESSÃO DE GST-4 ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DO GENE SKN-1 EM *C. elegans*.

Para avaliar se a metformina (após metabolismo bacteriano) está ativando o gene SKN-1 em *C. elegans*, utilizou-se cepas (CL2166 e QV224) com GFP fusionada à proteína GST-4 (*downstream* à ativação do gene SKN-1). Na cepa CL2166 (CL2166 – *dvs19 III*.), observou-se que um aumento de quase 60% da fluorescência de GFP::GST-4 em nematoides tratados com metformina (50 mM, após metabolismo bacteriano) de L1 a L4. Entretanto, tal aumento que não foi observado em animais da cepa nocaute para SKN-1 (QV224 - *dvs19 III*; *skn-1 (zj15) IV*) (**Figura 15 A-C**). Como grupo controle positivo para o aumento da expressão de GST-4 induzido por SKN-1, nematoides da cepa CL2166, na fase L3, foram expostos por 14 - 15 h ao t-BHQ 2 mM; observou-se um aumento de 150% da fluorescência de GFP::GST-4 em relação ao seu controle (**Figura 15 B-C**). Esses resultados demonstram que o aumento da expressão de GST-4 depende, principalmente, do gene SKN-1 em *C. elegans*, e que a metformina (após metabolismo bacteriano) ativa este gene, aumentando a expressão de GST-4 no nematoide.



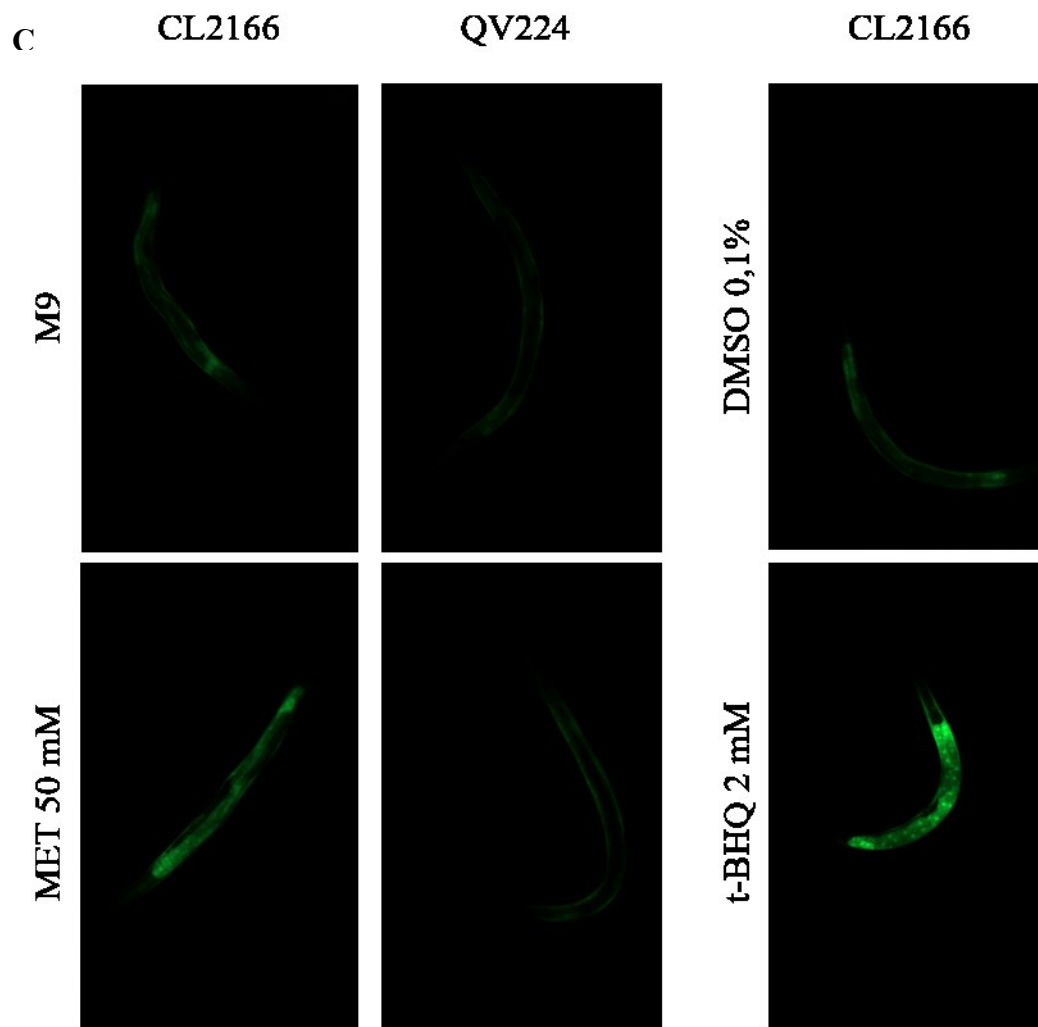


Figura 15: Metformina aumenta a expressão de GST-4 através da ativação do gene SKN-1 em *C. elegans*. (A) Expressão relativa de GST-4 em comparação ao controle das cepas CL2166 e QV224 contendo GFP::GST-4. Os nematoides de ambas as cepas foram expostos a metformina (50 mM) da fase L1 a L4. (B) Controle positivo de expressão de GST-4. Nematoides na fase L3 da cepa CL2166 expostos a 2 mM de t-BHQ durante 14-15 h. (C) Fotos representativas de cada grupo analisado. A fluorescência (GFP::GST-4) é apresentada como fluorescência [(fluorescência média - background)/área]. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ por ANOVA de dois fatores seguida do teste de Newman-Keuls (A) e teste t de Student (B). N = 30 vermes por grupo (derivado de 3 experimentos independentes).

6. DISCUSSÃO

A metformina é um fármaco amplamente utilizado em seres humanos para o tratamento de Diabetes Mellitus tipo II (DM II) (ORGANIZATION, 2013). Por outro lado, estudos experimentais têm demonstrado que este fármaco também possui efeitos benéficos não relacionados com a homeostase da glicose, mas sim com a proteção do estresse oxidativo gerado por ROS e com o aumento da longevidade (BATANDIER; GUIGAS; DETAILLE; EL-MIR *et al.*, 2006; DE HAES; FROONINCKX; VAN ASSCHE; SMOLDERS *et al.*, 2014; XIAO; LIU; KONG; ZHU *et al.*, 2022). De particular importância, tem-se observado o aumento da longevidade nas espécies de camundongos C57BL (*Mus musculus*), no inseto *D. melanogaster* e no nematoide *C. elegans* (MARTIN-MONTALVO; MERCKEN; MITCHELL; PALACIOS *et al.*, 2013; PRYOR; NORVAISAS; MARINOS; BEST *et al.*, 2019). As evidências experimentais têm sugerido que o aumento da longevidade induzido por metformina ocorre, ao menos em parte, pela modulação positiva da via do Nrf2, um fator de transcrição que regula a expressão de múltiplos genes antioxidantes, regulando o balanço redox do organismo (FARINA; VIEIRA; BUTTARI; PROFUMO *et al.*, 2021; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA, 2014). Considerando alvos *downstream* ao Nrf2 apresentam papel protetor contra o estresse oxidativo, incluindo aquele relacionado à ferroptose, neste estudo objetivou-se investigar se a metformina protege, via gene SKN-1 (ortólogo ao Nrf2 em nematódeos) contra a ferroptose em um modelo de dano induzido por citrato férrico amoniacal (FAC) em *C. elegans*.

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstraram que a metformina, quando em contato prévio com bactérias *E. coli* OP50, protege contra a mortalidade e a peroxidação lipídica induzida pelo modelo de *iron-overload* em nematoides N2, porém, não em nematoides nocautes para o gene SKN-1 (cepa QV225). Além disso, o tratamento com 50 mM de metformina, metabolizada durante 44 horas (iniciado em estágio L1), aumentou a expressão da proteína GST-4 marcada com GFP em animais tipo selvagens N2 (59%); porém, na cepa nocaute para SKN-1, o aumento da expressão foi pouco expressivo (17%).

O ferro (Fe) é um metal de transição essencial ao organismo humano, pois participa de diversos processos bioquímicos necessários para a vida. No entanto, os níveis aumentados de Fe no organismo causam toxicidade e, em *C. elegans*, o

aumento dos níveis de Fe diminui a sobrevivência (KLANG; SCHILLING; SORENSEN; SAHU *et al.*, 2014), além disso, alterações no ferro ferroso em *C. elegans* promove fragilidade no envelhecimento, podendo levar à ferroptose (JENKINS, N. L.; JAMES, S. A.; SALIM, A.; SUMARDY, F. *et al.*, 2020), a qual representa um tipo de morte celular dependente de ferro (DIXON; LEMBERG; LAMPRECHT; SKOUTA *et al.*, 2012). Conforme mencionado previamente, há evidências de que a metformina é capaz de aumentar a longevidade de *C. elegans* modulando positivamente o gene SKN-1, ortólogo de NRF-2 em mamíferos (ONKEN; DRISCOLL, 2010). Além disso, a ativação do gene NRF-2 tem se mostrado importante para a proteção da mortalidade ferroptótica, diminuindo os níveis de ROS e regulando de forma direta ou indireta o metabolismo da GSH e GPx4, do ferro e de lipídios (DODSON; CASTRO-PORTUGUEZ; ZHANG, 2019; HARADA; KANAYAMA; MARUYAMA; YOSHIDA *et al.*, 2011; HAYES; DINKOVA-KOSTOVA, 2014; URSINI, FULVIO; MAIORINO, MATILDE, 2020). Desta forma, hipotetizamos (previamente ao desenvolvimento deste trabalho) que seria possível a ocorrência de proteção da metformina contra a ferroptose em *C. elegans*, induzida por FAC, através da ativação do gene SKN-1.

Os resultados demonstram que a toxicidade causada pelo Fe, em um modelo de *iron overload*, causou mortalidade concentração e tempo dependente, assim como peroxidação lipídica em ambas as cepas, selvagem (N2) e nocaute para o gene SKN-1 (QV225) (**Figuras 8 e 12**). Esses dados corroboram com a literatura, demonstrando que a exposição ao ferro é tóxica ao *C. elegans* (KLANG; SCHILLING; SORENSEN; SAHU *et al.*, 2014). Nossos dados demonstraram um aumento da peroxidação lipídica nos nematoides expostos a 50 mM de FAC, no tempo de 48 horas (antes de indução significativa de mortalidade). Assim, sugere-se que a peroxidação (marcador de ferroptose) ocorre previamente à mortalidade. Estudos com Ferrostatina-1 poderiam reforçar o envolvimento da ferroptose no modelo. Neste contexto, dados do grupo (Mann *et al.* 2023, ainda não publicados) já demonstraram que a Ferrostatina-1 protege contra a peroxidação lipídica causada por FAC em um modelo experimental idêntico ao utilizado no atual estudo, demonstrando que a causa da peroxidação lipídica é ferroptótica. No mesmo estudo previamente mencionado (Mann *et al.* 2023, ainda não publicados), a Ferrostatina-1 também protegeu contra a mortalidade causada pelo FAC.

Observou-se que a metformina, quando metabolizada pela bactéria *E. coli*, na cepa selvagem N2, protegeu contra a mortalidade e da peroxidação lipídica induzida pela exposição ao FAC, tanto na concentração de 50 mM quanto na mais alta de 145 mM (**Figuras 10 e 11**). No entanto, foi observado que esta proteção não ocorre quando a metformina é oferecida ao verme sem metabolização prévia pela bactéria (**Figura 9**). O mesmo ocorre para a cepa nocaute para o gene SKN-1 (QV225), não ocorrendo a proteção contra a mortalidade induzida por FAC quando a metformina é oferecida ao verme sem metabolização prévia pela bactéria (**Figura 13**). Além disso, a cepa QV225 já demonstrou ser mais frágil na condição controle (ausência de FAC) nos estudos de sobrevivência (**Figura 12 e 13**). Adicionalmente, quando se avaliou os níveis de peroxidação lipídica, observou-se que o tratamento com metformina (após metabolização pela *E. coli*) não protegeu contra a indução de peroxidação por FAC. Ao contrário, o tratamento com metformina (após metabolização pela *E. coli*) causou um aumento nos níveis de peroxidação lipídica em comparação ao grupo tratado apenas com FAC (**Figura 14**). Em conjunto, esses dados corroboram com os dados da literatura, que demonstram que o aumento da longevidade em *C. elegans* depende da metabolização da metformina pela *E. coli*, e da ativação do gene SKN-1 (CABREIRO; AU; LEUNG; VERGARA-IRIGARAY *et al.*, 2013; ONKEN; DRISCOLL, 2010); nossos dados demonstram que o mesmo ocorre na proteção da metformina contra mortalidade e peroxidação lipídica induzidos pelo modelo de *iron-overload* através da exposição ao FAC (**Figura 16**).

Para comprovar se a metformina estaria protegendo através da ativação do gene SKN-1, avaliou-se a expressão da GST-4, clássico alvo *downstream* cujo aumento da expressão proteica depende da ativação do gene SKN-1 (OLIVEIRA; PORTER ABATE; DILKS; LANDIS *et al.*, 2009). Particularmente, investigou-se o efeito do tratamento com metformina na expressão proteica (medida através da quantificação da fluorescência) nas cepas CL2166 (GST-4::GFP) e QV224 (nocaute para SKN-1 e GST-4::GFP). O tratamento com metformina (metabolizada por *E. coli*) durante 44 horas (da fase L1 a L4 dos nematoides) aumentou significativamente em 59% a expressão proteica de GST-4, em relação ao controle, na cepa CL2166, demonstrando que o tratamento com a metformina ativa o gene SKN-1 (**Figura 15**); corroborando com os dados de proteção da mortalidade e peroxidação lipídica induzidos pelo modelo de *iron-overload* através da exposição ao FAC, possivelmente

pelo motivo da metformina ativar as defesas antioxidantes em *C. elegans* antes serem expostos ao FAC.

Já na cepa QV224, nocaute para o gene SKN-1, também se observou um leve aumento da expressão de GST-4; porém, foi pouco expressivo (17% em relação ao controle) (**Figura 15**). Possivelmente esse leve aumento se deve ao fato de outras vias também serem capazes de ativar a GST-4, como por exemplo o gene DAF-16, ortólogo ao FoxO em mamíferos (QI; JI; LE; LI *et al.*, 2021). No entanto, mesmo induzindo um pequeno aumento na expressão de GST-4 na cepa nocaute para o gene SKN-1, o tratamento com metformina não foi capaz de proteger contra a mortalidade e peroxidação lipídica induzidas por FAC, corroborando a ideia de que a proteção observada contra a morte ferroptótica pelo modelo de *iron-overload* depende da via de ativação de SKN-1 em *C. elegans* (**Figura 16**).

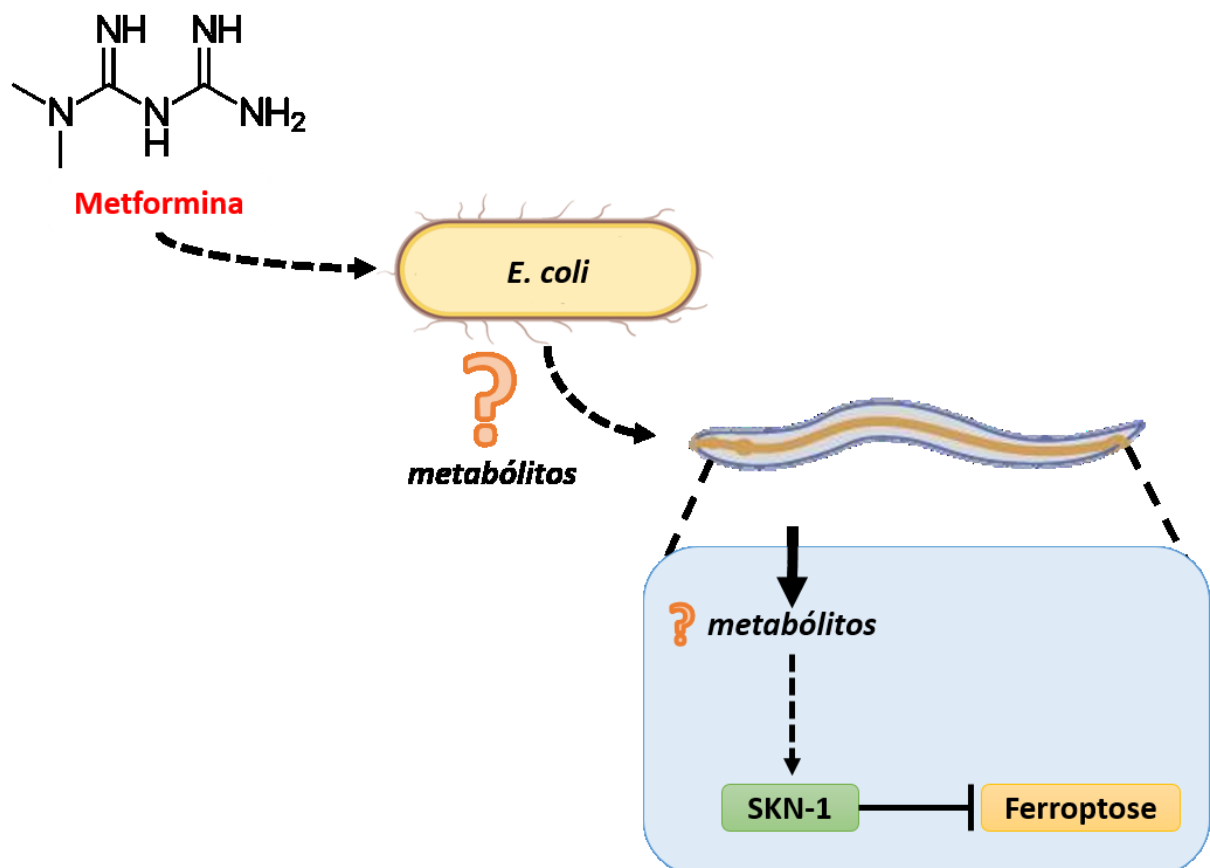


Figura 16: Possível via de atuação da metformina em *C. elegans*. Primeiramente a metformina é metabolizada pela bactéria *E. coli*, a qual o *C. elegans* se alimenta. Suspeita-se que algum metabólito da metformina ative o gene SKN-1 em *C. elegans*, levando a ativação de genes que possam prevenir a ferroptose.

A literatura relata que o tratamento com metformina, após metabolização por bactéria OP50, é capaz de ativar *aak-2* em *C. elegans*, ortólogo à AMPK (do inglês, *Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase*) em mamíferos e, conseqüentemente, ativa o gene SKN-1, aumentando a longevidade (CABREIRO; AU; LEUNG; VERGARA-IRIGARAY *et al.*, 2013; ONKEN; DRISCOLL, 2010). Nosso estudo demonstra que a ativação do gene SKN-1 pelo tratamento com metformina (após metabolização) é necessária para que ocorra a proteção contra a mortalidade e peroxidação lipídica induzidos pelo modelo de *iron-overload* através da exposição dos nematoides ao FAC. Segundo Pryor *et al.* 2019, a metformina, através da metabolização da bactéria *E. coli*, aumenta os níveis de agmatina (aminoguanidina sintetizada pela decarboxilação do aminoácido arginina) no organismo, aumentando a longevidade e a oxidação de ácidos graxos em *C. elegans*, assim como causando aumento da longevidade e diminuição de peso em *Drosophila melanogaster* (PRYOR; NORVAISAS; MARINOS; BEST *et al.*, 2019). Desta forma, o aumento dos níveis de agmatina no organismo do nematoide, resultantes da metabolização e/ou ação da metformina na *E. coli*, pode ser um possível responsável pela proteção induzida pelo tratamento com metformina na mortalidade induzida por FAC. Esta hipótese, embora necessite de comprovação, é reforçada pelo fato de que a agmatina é capaz de ativar o gene NRF-2 em mamíferos (FREITAS; EGEE; BUENDÍA; NAVARRO *et al.*, 2015).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo conseguiu-se padronizar um modelo de *iron-overload* baseado na exposição aguda a FAC em *C. elegans*, e observou-se que a metformina metabolizada pela bactéria *E. coli* protege contra a mortalidade e peroxidação lipídica causados pela exposição de *C. elegans* ao FAC. Além disso, a metformina foi capaz de aumentar os níveis de expressão de GST-4 na fase L4 na cepa selvagem (N2) de *C. elegans*. Já na cepa nocaute para o gene SKN-1 exposta às mesmas condições, não se observou proteção do tratamento com a metformina, demonstrando esta protege da mortalidade e da peroxidação lipídica através da ativação do gene SKN-1, confirmando a hipótese desta dissertação, em que a metformina previne a ferroptose causada pelo modelo de *iron-overload* baseado na exposição aguda a FAC em *C. elegans* através da ativação do gene SKN-1.

Mais estudos com ferrostatina-1, para investigação da ferroptose no modelo de *iron-overload* através da exposição do *C. elegans* ao FAC, são necessários. Além disso, para melhor investigação da via de atuação e possível metabólito da metformina que atuem na proteção conta o dado ferroptótico, é importante a realização de experimentos para avaliar se a exposição direta a agmatina é capaz de impedir a mortalidade e a peroxidação lipídica causadas por FAC em *C. elegans*, permitindo um maior entendimento a respeito da via bioquímica de proteção da metformina na mortalidade causada pelo no modelo de *iron-overload* através do FAC em *C. elegans*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, J.; STEWART, D.; TOUCHARD, C.; BOINAPALLY, S. *et al.* Nrf2, a Cap'n'Collar Transcription Factor, Regulates Induction of the Heme Oxygenase-1 Gene*. **Journal of Biological Chemistry**, 274, n. 37, p. 26071-26078, 1999/09/10/ 1999.
- ALTUN, Z.F. e HALL, D.H. 2009. Introdução. **WormAtlas**. doi:10.3908/wormatlas.1.1
- AISEN, P. Transferrin receptor 1. **Int J Biochem Cell Biol**, 36, n. 11, p. 2137-2143, Nov 2004.
- ANDERSON, C. P.; LEIBOLD, E. A. Mechanisms of iron metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **Front Pharmacol**, 5, p. 113, 2014.
- APAROY, P.; REDDY, K. K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5- LOX inhibitors. **Curr Med Chem**, 19, n. 22, p. 3763-3778, 2012.
- AROSIO, P.; LEVI, S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage^{1, 2} Guest Editor: Mario Comporti ²This article is part of a series of reviews on "Iron and Cellular Redox Status." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. **Free Radical Biology and Medicine**, 33, n. 4, p. 457-463, 2002/08/15/ 2002.
- ARTAL-SANZ, M.; DE JONG, L.; TAVERNARAKIS, N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. **Biotechnol J**, 1, n. 12, p. 1405-1418, Dec 2006.
- BASSI, M. T.; GASOL, E.; MANZONI, M.; PINEDA, M. *et al.* Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc. **Pflugers Arch**, 442, n. 2, p. 286-296, May 2001.
- BATANDIER, C.; GUIGAS, B.; DETAILLE, D.; EL-MIR, M. *et al.* The ROS Production Induced by a Reverse-Electron Flux at Respiratory-Chain Complex 1 is Hampered by Metformin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 38, n. 1, p. 33-42, 2006/02/01 2006.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, 77, n. 1, p. 71-94, May 1974.
- CABANTCHIK, Z. I. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. **Front Pharmacol**, 5, p. 45, 2014.
- CABREIRO, F.; AU, C.; LEUNG, K. Y.; VERGARA-IRIGARAY, N. *et al.* Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. **Cell**, 153, n. 1, p. 228-239, Mar 28 2013.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, 263, n. 5148, p. 802-805, Feb 11 1994.

CHANAS, S. A.; JIANG, Q.; MCMAHON, M.; MCWALTER, G. K. *et al.* Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. **Biochem J**, 365, n. Pt 2, p. 405-416, Jul 15 2002.

CHIFMAN, J.; LAUBENBACHER, R.; TORTI, S. V. A systems biology approach to iron metabolism. **Adv Exp Med Biol**, 844, p. 201-225, 2014.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, 200, n. 2, p. 387-407, Jun 2015.

DE HAES, W.; FROONINCKX, L.; VAN ASSCHE, R.; SMOLDERS, A. *et al.* Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 24, p. E2501-2509, Jun 17 2014.

DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; SKOUTA, R. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, 149, n. 5, p. 1060-1072, May 25 2012.

DODSON, M.; CASTRO-PORTUGUEZ, R.; ZHANG, D. D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. **Redox Biol**, 23, p. 101107, May 2019.

ESPADA, L.; DAKHOVNIK, A.; CHAUDHARI, P.; MARTIROSYAN, A. *et al.* Loss of metabolic plasticity underlies metformin toxicity in aged *Caenorhabditis elegans*. **Nat Metab**, 2, n. 11, p. 1316-1331, Nov 2020.

FAN, R.; PAN, T.; ZHU, A. L.; ZHANG, M. H. Anti-inflammatory and anti-arthritis properties of naringenin via attenuation of NF- κ B and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. **Pharmacol Rep**, 69, n. 5, p. 1021-1029, Oct 2017.

FARINA, M.; VIEIRA, L. E.; BUTTARI, B.; PROFUMO, E. *et al.* The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review. **Molecules**, 26, n. 16, Aug 18 2021.

FEINBERG, E. H.; VANHOVEN, M. K.; BENDESKY, A.; WANG, G. *et al.* GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. **Neuron**, 57, n. 3, p. 353-363, Feb 7 2008.

FORCINA, G. C.; DIXON, S. J. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis. **Proteomics**, 19, n. 18, p. e1800311, Sep 2019.

FORETZ, M.; VIOLLET, B. [New promises for metformin: advances in the understanding of its mechanisms of action]. **Med Sci (Paris)**, 30, n. 1, p. 82-92, Jan 2014.

FREITAS, A. E.; EGEEA, J.; BUENDÍA, I.; NAVARRO, E. *et al.* Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. **Mol Neurobiol**, 51, n. 3, p. 1504-1519, 2015.

FULLERTON, M. D.; GALIC, S.; MARCINKO, K.; SIKKEMA, S. *et al.* Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. **Nat Med**, 19, n. 12, p. 1649-1654, Dec 2013.

GALARIS, D.; BARBOUTI, A.; PANTOPOULOS, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, 1866, n. 12, p. 118535, Dec 2019.

GANZ, T. Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. **Cell Metab**, 7, n. 4, p. 288-290, Apr 2008.

GRAHAME HARDIE, D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. **J Intern Med**, 276, n. 6, p. 543-559, Dec 2014.

HARADA, N.; KANAYAMA, M.; MARUYAMA, A.; YOSHIDA, A. *et al.* Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 508, n. 1, p. 101-109, 2011/04/01/ 2011.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. **Trends Biochem Sci**, 39, n. 4, p. 199-218, Apr 2014.

HIDER, R. C.; KONG, X. Iron speciation in the cytosol: an overview. **Dalton Transactions**, 42, n. 9, p. 3220-3229, 2013. 10.1039/C2DT32149A.

HIDER, R. C.; KONG, X. L. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. **BioMetals**, 24, n. 6, p. 1179-1187, 2011/12/01 2011.

IMAI, H.; MATSUOKA, M.; KUMAGAI, T.; SAKAMOTO, T. *et al.* Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 403, p. 143-170, 2017.

ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes Dev**, 13, n. 1, p. 76-86, Jan 1 1999.

JENKINS, N. L.; JAMES, S. A.; SALIM, A.; SUMARDY, F. *et al.* Changes in ferrous iron and glutathione promote ferroptosis and frailty in aging *Caenorhabditis elegans*. **eLife**, 9, p. e56580, 2020/07/21 2020.

JENKINS, N. L.; JAMES, S. A.; SALIM, A.; SUMARDY, F. *et al.* Changes in ferrous iron and glutathione promote ferroptosis and frailty in aging *Caenorhabditis elegans*. **Elife**, 9, Jul 21 2020.

JIANG, X.; STOCKWELL, B. R.; CONRAD, M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 22, n. 4, p. 266-282, Apr 2021.

KAGAN, V. E.; MAO, G.; QU, F.; ANGELI, J. P. F. *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. **Nature Chemical Biology**, 13, n. 1, p. 81-90, 2017/01/01 2017.

KATILA, N.; BHURTEL, S.; PARK, P. H.; CHOI, D. Y. Metformin attenuates rotenone-induced oxidative stress and mitochondrial damage via the AKT/Nrf2 pathway. **Neurochem Int**, 148, p. 105120, Sep 2021.

KAWABATA, H.; GERMAIN, R. S.; VUONG, P. T.; NAKAMAKI, T. *et al.* Transferrin Receptor 2- α Supports Cell Growth Both in Iron-chelated Cultured Cells and in Vivo *. **Journal of Biological Chemistry**, 275, n. 22, p. 16618-16625, 2000/06/02/ 2000.

KEW, M. C. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. **Liver Cancer**, 3, n. 1, p. 31-40, Mar 2014.

KLANG, I. M.; SCHILLING, B.; SORENSEN, D. J.; SAHU, A. K. *et al.* Iron promotes protein insolubility and aging in *C. elegans*. **Aging (Albany NY)**, 6, n. 11, p. 975-991, Nov 2014.

KNUTSON, M. D. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. **Nutr Rev**, 65, n. 7, p. 335-340, Jul 2007.

LANE, D. J.; BAE, D. H.; MERLOT, A. M.; SAHNI, S. *et al.* Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. **Nutrients**, 7, n. 4, p. 2274-2296, Mar 31 2015.

LE, N. T.; RICHARDSON, D. R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. **Biochim Biophys Acta**, 1603, n. 1, p. 31-46, Oct 2 2002.

LEDERMAN, H. M.; COHEN, A.; LEE, J. W.; FREEDMAN, M. H. *et al.* Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. **Blood**, 64, n. 3, p. 748-753, 1984.

LEUNG, M. C.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicol Sci**, 106, n. 1, p. 5-28, Nov 2008.

LV, H.; SHANG, P. The significance, trafficking and determination of labile iron in cytosol, mitochondria and lysosomes. **Metallomics**, 10, n. 7, p. 899-916, Jul 18 2018.

LV, Y.; WU, M.; WANG, Z.; WANG, J. Ferroptosis: From regulation of lipid peroxidation to the treatment of diseases. **Cell Biol Toxicol**, Dec 2 2022.

MALIN, S. K.; KASHYAP, S. R. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, 21, n. 5, p. 323-329, Oct 2014.

MARTIN-MONTALVO, A.; MERCKEN, E. M.; MITCHELL, S. J.; PALACIOS, H. H. *et al.* Metformin improves healthspan and lifespan in mice. **Nature Communications**, 4, n. 1, p. 2192, 2013/07/30 2013.

MARTINS, A. C.; ALMEIDA, J. I.; LIMA, I. S.; KAPITÃO, A. S. *et al.* Iron Metabolism and the Inflammatory Response. **IUBMB Life**, 69, n. 6, p. 442-450, Jun 2017.

MCGHEE, J. D. The Caenorhabditis elegans intestine. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 2, n. 3, p. 347-367, May-Jun 2013.

MCKIE, A. T.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G. O.; ROLFS, A. *et al.* An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. **Science**, 291, n. 5509, p. 1755-1759, 2001.

MCMAHON, M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; CHANAS, S. A. *et al.* The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. **Cancer Res**, 61, n. 8, p. 3299-3307, Apr 15 2001.

MOUJALLED, D.; STRASSER, A.; LIDDELL, J. R. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. **Cell Death & Differentiation**, 28, n. 7, p. 2029-2044, 2021/07/01 2021.

MURAKAMI, S. Caenorhabditis elegans as a model system to study aging of learning and memory. **Mol Neurobiol**, 35, n. 1, p. 85-94, Feb 2007.

NAIGAMWALLA, D. Z.; WEBB, J. A.; GIGER, U. Iron deficiency anemia. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, 53, n. 3, p. 250-256, 2012/03// 2012.

OHGAMI, R. S.; CAMPAGNA, D. R.; GREER, E. L.; ANTIOCHOS, B. *et al.* Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. **Nat Genet**, 37, n. 11, p. 1264-1269, Nov 2005.

OLIVEIRA, R. P.; PORTER ABATE, J.; DILKS, K.; LANDIS, J. *et al.* Condition-adapted stress and longevity gene regulation by Caenorhabditis elegans SKN-1/Nrf. **Aging Cell**, 8, n. 5, p. 524-541, Sep 2009.

ONKEN, B.; DRISCOLL, M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend C. elegans Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLoS One**, 5, n. 1, p. e8758, Jan 18 2010.

ORGANIZATION, W. H. Implementation tools: package of essential noncommunicable (PEN) disease interventions for primary health care in low-resource settings. 2013.

PEREZ, M. A.; MAGTANONG, L.; DIXON, S. J.; WATTS, J. L. Dietary Lipids Induce Ferroptosis in Caenorhabditiselegans and Human Cancer Cells. **Dev Cell**, 54, n. 4, p. 447-454.e444, Aug 24 2020.

PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Lipoyxygenase inhibitors: a comparative QSAR study review and evaluation of new QSARs. **Med Res Rev**, 28, n. 1, p. 39-117, Jan 2008.

PRYOR, R.; NORVAISAS, P.; MARINOS, G.; BEST, L. *et al.* Host-Microbe-Drug-Nutrient Screen Identifies Bacterial Effectors of Metformin Therapy. **Cell**, 178, n. 6, p. 1299-1312.e1229, Sep 5 2019.

QI, Z.; JI, H.; LE, M.; LI, H. *et al.* Sulforaphane promotes *C. elegans* longevity and healthspan via DAF-16/DAF-2 insulin/IGF-1 signaling. **Aging (Albany NY)**, 13, n. 2, p. 1649-1670, Jan 20 2021.

RAGHUNATH, A.; SUNDARRAJ, K.; NAGARAJAN, R.; ARFUSO, F. *et al.* Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. **Redox Biology**, 17, p. 297-314, 2018/07/01/ 2018.

REICHERT, C. O.; DE FREITAS, F. A.; SAMPAIO-SILVA, J.; ROKITA-ROSA, L. *et al.* Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. **Int J Mol Sci**, 21, n. 22, Nov 20 2020.

RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B. J.; PRIESS, J. R. Introduction to *C. elegans*. In: RIDDLE, D. L.; BLUMENTHAL, T., *et al.* (Ed.). **C. elegans II**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1997.

ROUAULT, T. A. The Intestinal Heme Transporter Revealed. **Cell**, 122, n. 5, p. 649-651, 2005/09/09/ 2005.

SANTOMAURO JÚN, A. C.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T.; SOUTO, R. P. d. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 52, 2008.

SCHULZ, T. J.; ZARSE, K.; VOIGT, A.; URBAN, N. *et al.* Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. **Cell Metab**, 6, n. 4, p. 280-293, Oct 2007.

SHEOKAND, N.; KUMAR, S.; MALHOTRA, H.; TILLU, V. *et al.* Secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a multifunctional autocrine transferrin receptor for cellular iron acquisition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1830, n. 6, p. 3816-3827, 2013/06/01/ 2013.

STOCKWELL, B. R.; FRIEDMANN ANGELI, J. P.; BAYIR, H.; BUSH, A. I. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, 171, n. 2, p. 273-285, Oct 5 2017.

TONG, K. I.; KATOH, Y.; KUSUNOKI, H.; ITOH, K. *et al.* Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. **Molecular and Cellular Biology**, 26, n. 8, p. 2887-2900, 2006.

TU, W.; WANG, H.; LI, S.; LIU, Q. *et al.* The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. **Aging Dis**, 10, n. 3, p. 637-651, Jun 2019.

TULLET, J. M. A.; GREEN, J. W.; AU, C.; BENEDETTO, A. *et al.* The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. **Aging Cell**, 16, n. 5, p. 1191-1194, Oct 2017.

TURBAN, S.; STRETTON, C.; DROUIN, O.; GREEN, C. J. *et al.* Defining the contribution of AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase C (PKC) in regulation of glucose uptake by metformin in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, 287, n. 24, p. 20088-20099, Jun 8 2012.

URSINI, F.; MAIORINO, M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. **Free Radic Biol Med**, 152, p. 175-185, May 20 2020.

URSINI, F.; MAIORINO, M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. **Free Radical Biology and Medicine**, 152, p. 175-185, 2020/05/20/ 2020.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 839, n. 1, p. 62-70, 1985/03/29/ 1985.

URUNO, A.; YAGISHITA, Y.; YAMAMOTO, M. The Keap1–Nrf2 system and diabetes mellitus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 566, p. 76-84, 2015/01/15/ 2015.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; SANZ GARCIA, N.; LECLERC, J. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clin Sci (Lond)**, 122, n. 6, p. 253-270, Mar 2012.

VOLANI, C.; DOERRIER, C.; DEMETZ, E.; HASCHKA, D. *et al.* Dietary iron loading negatively affects liver mitochondrial function. **Metallomics**, 9, n. 11, p. 1634-1644, Nov 15 2017.

WAKABAYASHI, N.; ITOH, K.; WAKABAYASHI, J.; MOTOHASHI, H. *et al.* Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. **Nat Genet**, 35, n. 3, p. 238-245, Nov 2003.

WANG, D. S.; JONKER, J. W.; KATO, Y.; KUSUHARA, H. *et al.* Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. **J Pharmacol Exp Ther**, 302, n. 2, p. 510-515, Aug 2002.

WARD, R. J.; ZUCCA, F. A.; DUYN, J. H.; CRICHTON, R. R. *et al.* The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **Lancet Neurol**, 13, n. 10, p. 1045-1060, Oct 2014.

WEST, A. P.; BENNETT, M. J.; SELLERS, V. M.; ANDREWS, N. C. *et al.* Comparison of the Interactions of Transferrin Receptor and Transferrin Receptor 2 with Transferrin

and the Hereditary Hemochromatosis Protein HFE*. **Journal of Biological Chemistry**, 275, n. 49, p. 38135-38138, 2000/12/08/ 2000.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicol Lett**, 82-83, p. 969-974, Dec 1995.

XIAO, Y.; LIU, F.; KONG, Q.; ZHU, X. *et al.* Metformin induces S-adenosylmethionine restriction to extend the *Caenorhabditis elegans* healthspan through H3K4me3 modifiers. **Aging Cell**, 21, n. 3, p. e13567, Mar 2022.

YAGODA, N.; VON RECHENBERG, M.; ZAGANJOR, E.; BAUER, A. J. *et al.* RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. **Nature**, 447, n. 7146, p. 864-868, Jun 14 2007.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. **Trends Cell Biol**, 26, n. 3, p. 165-176, Mar 2016.

YOUNG, L. H.; LI, J.; BARON, S. J.; RUSSELL, R. R. AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart. **Trends Cardiovasc Med**, 15, n. 3, p. 110-118, Apr 2005.

ZANG, M.; ZUCCOLLO, A.; HOU, X.; NAGATA, D. *et al.* AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. **J Biol Chem**, 279, n. 46, p. 47898-47905, Nov 12 2004.

ZHANG, W.; XU, J. H.; YU, T.; CHEN, Q. K. Effects of berberine and metformin on intestinal inflammation and gut microbiome composition in db/db mice. **Biomed Pharmacother**, 118, p. 109131, Oct 2019.

ZHENG, J.; GREENWAY, F. L. *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. **Int J Obes (Lond)**, 36, n. 2, p. 186-194, Feb 2012.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J Clin Invest**, 108, n. 8, p. 1167-1174, Oct 2001.