

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

KAREN KICH GOMES

RELAÇÃO ENTRE O ENVELHECIMENTO DE MACHOS E FÊMEAS DE
Drosophila melanogaster COM A FERROPTOSE

São Gabriel

2024

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

KAREN KICH GOMES

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72

**RELAÇÃO ENTRE O ENVELHECIMENTO DE MACHOS E FÊMEAS DE
Drosophila melanogaster COM A FERROPTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós- graduação
Stricto sensu em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de Doutora em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Professora Dr^a. Thaís Posser

Coorientador: Professor Dr. Jeferson Luis Franco

São Gabriel

2024

KAREN KICH GOMES

73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pela autora através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

MM187a

Gomes, Karen Kich

RELAÇÃO ENTRE O ENVELHECIMENTO DE MACHOS E FÊMEAS DE *Drosophila melanogaster* COM A FERROPTOSE

65 p.

Tese (Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2024.

"Orientação: Thaís Posser".

KAREN KICH GOMES

RELAÇÃO ENTRE O ENVELHECIMENTO DE MACHOS E FÊMEAS DE *Drosophila melanogaster* COM A FERROPTOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: 25, março de 2024.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Thais Posser
Orientador
UNIPAMPA

Profa. Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé
UNIPAMPA

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
UNIPAMPA

Prof. Dr. Nelson Rodrigues de Carvalho

IFFar



Assinado eletronicamente por **ANDRES DELGADO CANEDO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/03/2024, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **LUCIA HELENA DO CANTO VINADE, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/04/2024, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **THAIS POSSER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/04/2024, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Nélson Rodrigues de Carvalho, Usuário Externo**, em 01/04/2024, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1402176** e o código CRC **C6921E3B**.

92

93

94

AGRADECIMENTOS

95

96

97 Expresso minha gratidão à minha família, especialmente à minha mãe Juliana Kich e à
98 minha amada avó Ely, que desempenhou um papel de segunda mãe ao longo desta jornada.
99 Ambas ofereceram apoio incondicional, carinho e suporte em todos os momentos da pós-
100 graduação e da vida.

101 Aos colegas e amigos do grupo GPEOSCEL, agradeço por todos os ensinamentos,
102 conversas, risadas e pelo mate diário, que nunca faltou. Um agradecimento especial às
103 meninas Ana Beatriz, Jaciana, Maria e Luana, que sempre ajudaram no trabalho com boa
104 vontade e disposição.

105 Expresso minha imensa gratidão à minha orientadora, Professora Dr^a. Thaís Posser, e
106 ao meu co-orientador, Professor Dr. Jeferson Franco, por todas as oportunidades oferecidas,
107 especialmente no aprimoramento profissional e crescimento pessoal. Sem vocês, este trabalho
108 não seria possível. Obrigada pelos ensinamentos, cobranças, conversas e risos. Vocês são
109 pessoas especiais que deixaram uma marca indelével em minha história.

110 Agradeço ao meu namorado, que esteve ao meu lado durante toda a trajetória
111 acadêmica, oferecendo o apoio necessário.

112 A todos os meus amigos de São Gabriel e Rosário do Sul, meu agradecimento por
113 sempre ajudarem de alguma forma.

114 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa
115 concedida.

116 À Universidade Federal do Pampa, por proporcionar a busca e agregação de
117 conhecimento científico.

118 À banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com o trabalho.

119 Agradeço a Deus pelas oportunidades e por guiar e iluminar meus passos nesta
120 caminhada.

121 E a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta pesquisa científica.

122

123

124

125

126

127

128

129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162

Todo amanhecer é sempre o mesmo e também sempre diferente. Cada um de nós faz o seu amanhã. E juntos fazemos o nosso!

RESUMO

163

164 O processo de envelhecimento é inevitável na vida dos seres vivo, esse processo se manifesta
165 por uma diminuição funcional nas funções fisiológicas e comportamentais, resultando em
166 fragilidade, doenças e eventual morte. Nas últimas décadas, o interesse pelo envelhecimento
167 aumentou significativamente, devido ao fato que os idosos constituem uma parcela cada vez
168 maior da população, aumentando cada vez mais a necessidade de recursos dos países para esta
169 área da saúde. Harman, em sua teoria dos radicais livres (1950), delineou o mecanismo
170 fundamental do envelhecimento como consequência do acúmulo de espécies reativas de
171 oxigênio (EROs), originadas do metabolismo celular, e da redução na expectativa de vida.
172 Pesquisas mais recentes indicam que outros processos, como o acúmulo de ferro (Fe), têm
173 um papel fundamental na promoção do envelhecimento. O Fe é um micronutriente essencial
174 na vida dos seres vivos, participando de processos biológicos, como respiração celular,
175 produção de energia, síntese de DNA, ecdisona, lipídios e metabolismo da dopamina.
176 Alterações em seu mecanismo regulatório, resultando em acúmulo ou deficiência, podem ser
177 prejudicial ao organismo. O acúmulo de Fe lábil pode acarretar em uma morte celular
178 denominada ferroptose. A ferroptose, é uma forma de morte celular dependente de Fe,
179 compreende estágios como esgotamento de glutathiona (GSH) e/ou glutathiona peroxidase 4
180 (GPx4), aumento do Fe intracelular, produção excessiva de EROs e peroxidação lipídica. Esse
181 tipo específico de morte celular, tem sido associado à patogênese de diversos distúrbios,
182 abrangendo condições que vão desde doenças cardiovasculares até distúrbios neurológicos. A
183 compreensão crescente de como a ferroptose desempenha um papel central em diferentes
184 contextos patológicos destaca sua complexidade e importância em uma variedade de
185 condições médicas. Este estudo explorou parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo
186 durante o envelhecimento de machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster*, indicando, em
187 conjunto com os níveis elevados de Fe, a presença de ferroptose. Nossos resultados
188 evidenciaram que as moscas mais velhas (30 dias de idade) de ambos os sexos apresentaram
189 comprometimento na locomoção e equilíbrio quando comparadas às moscas mais jovens (5
190 dias de idade). Nós também observamos que as moscas mais velhas produziram níveis mais
191 elevados de EROs, redução nos níveis da GSH e aumento na peroxidação lipídica. Em
192 paralelo, os níveis de Fe estavam aumentados na hemolinfa das moscas. A depleção de GSH
193 com dietil-maleato- (DEM) potencializou os prejuízos comportamentais associados à idade.
194 Nossos dados revelaram efeitos bioquímicos característicos da ocorrência de ferroptose ao
195 longo do envelhecimento de *Drosophila melanogaster*, destacando a participação da GSH nos
196 danos associados à idade, parcialmente atribuídos aos elevados níveis de Fe. O presente

197 estudo contribuiu para um maior delineamento dos eventos bioquímicos que participam do
198 processo do envelhecimento o que colabora para o surgimento de novas abordagens
199 terapêuticas que visem melhorar a qualidade de vida dos idosos.

200

201 Palavras-Chave: Mosca da fruta; envelhecimento; fragilidade; EROs; ferroptose.

202

203

204

ABSTRACT

205 The aging process is inevitable in the life of living organisms. This process is characterized by
206 a functional decline in physiological and behavioral functions, resulting in frailty, diseases,
207 and eventual death. Over the last few decades, interest in aging has significantly grown, partly
208 due to the fact that the elderly have become a larger portion of the population, resulting in
209 increased healthcare expenditures by nations. Harman, in his free radical theory (1950),
210 outlined the fundamental mechanism of aging because of the accumulation of reactive oxygen
211 species (ROS) originating from cellular metabolism and a reduction in life expectancy. Recent
212 research indicates that other processes, such as the accumulation of iron (Fe), play a crucial
213 role in promoting aging. Fe is an essential micronutrient in the life of living organisms,
214 participating in biological processes such as cellular respiration, energy production, DNA
215 synthesis, ecdysone, and lipid and dopamine metabolism. Alterations in its regulatory
216 mechanism, resulting in accumulation or deficiency, can be detrimental to the organism. The
217 accumulation of labile iron can lead to a form of cell death known as ferroptosis. Ferroptosis,
218 a form of iron-dependent cell death, involves stages such as glutathione (GSH) and/or
219 glutathione peroxidase 4 (GPx4) depletion, increased intracellular iron, and excessive (ROS).
220 Reproduction, and lipid peroxidation. This specific type of cell death has been associated with
221 the pathogenesis of various disorders, encompassing conditions ranging from cardiovascular
222 diseases to neurological disorders. The increasing understanding of how ferroptosis plays a
223 central role in different pathological contexts highlights its complexity and importance in a
224 variety of medical conditions. This study investigated behavioral and oxidative stress
225 parameters during the aging process of male and female *Drosophila melanogaster*, indicating,
226 in conjunction with elevated iron levels, the presence of ferroptosis. Our results revealed that
227 older flies (30 days old) of both sexes exhibited impaired locomotion and balance compared
228 to younger flies (5 days old). We also observed that older flies produced higher levels of
229 ROS, a decrease in GSH levels, and an increase in lipid peroxidation. In parallel, Fe levels
230 were elevated in the hemolymph of the flies. Depletion of GSH with diethyl maleate (DEM)

231 potentiated age-associated behavioral impairments. Our data revealed biochemical effects
232 characteristic of ferroptosis occurrence during the aging of *Drosophila melanogaster*,
233 emphasizing the involvement of GSH in age-related damage, partially attributed to elevated
234 Fe levels. The current study enhances our understanding of the biochemical events involved
235 in the aging process and contributes to the development of new therapeutic approaches aimed
236 at improving the quality of life for the elderly.

237

238 Keywords: Fruit flies; aging; frailty; ROS, ferroptosis.

239

240

241

LISTA DE FIGURAS

242

243 **Figura 1:** Esquema representativo da reação de Fenton..... 16

244 **Figura 2:** Esquema representativo dos mecanismos bioquímicos envolvidos na Ferroptose. 17

245 **Figura 3:** Esquema representativo do sistema de defesas antioxidantes enzimáticos 19

246 **Figura 4:** Representação de macho e fêmea de *Drosophila melanogaster*21

247 **Figura 5:** Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* 21

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

267

268 CAT- Catalase

269 DCF-DA- 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína

270 DNA- Ácido desoxirribonucléico

271 DEM-Dietil maleato

272 ERNs- Espécies Reativas de Nitrogênio

273 EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

274 Fe- Ferro

275 Fe²⁺- Ferro ferroso

276 Fe³⁺- Ferro férrico

277 GSH- Glutathiona reduzida/Reduced Glutathione

278 GST- Glutathiona S-transferase/ Glutathione S-transferase

279 GSSG- Glutathiona oxidada

280 GPx- Glutathiona peroxidase

281 GPx4- Glutathiona peroxidase 4

282 GR- Glutathiona redutase

283 4-HNE- 4-hidroxinonal

284 HEPES- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

285 H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

286 HO-1- Heme oxigenase I/Heme oxygenase

287 KCL- Cloreto de potássio

288 MDA- Malondealdeído

289 OH[°]- Radical hidroxila

290 O₂[°]- Radical superóxido

291 ONOO- Peroxinitrito

292 ROS- Reactive Oxygen Species

293 SOD- Superóxido dismutase/Superoxide dismutase

294 SH- Radical sulfidrila

295

296

297

298

299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, consta uma breve revisão da literatura sobre os temas trabalhados nesta tese. A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de manuscritos, que se encontram nos itens **MANUSCRITO**. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O item **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, encontrado no final desta tese, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados dos manuscritos presentes neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS** desta tese.

333

334

SUMÁRIO

335

336 RESUMO5

337 ABSTRACT6

338 LISTA DE FIGURAS7

339 LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS8

340 APRESENTAÇÃO.....9

341 1. Introdução.....10

342 2. Revisão da literatura.....12

343 2.1 Envelhecimento11

344 2.2 Ferro e envelhecimento.....13

345 2.3 Ferroptose.....14

346 2.4 Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante.....17

347 2.5 *Drosophila melanogaster* como modelo para envelhecimento19

348 3. Objetivos22

349 3.1 Objetivo geral22

350 3.2 Objetivos específicos22

351 4. Resultados.....22

352 5. Conclusão.....54

353 6. Outros trabalhos e atividades desenvolvidas durante o doutorado54

354 Referências Bibliográficas.....56

355

356

357 1. Introdução

358

359 O envelhecimento é um processo fisiológico frequentemente associado à perda
360 neuronal, deficiências motoras, alterações no metabolismo, senescência celular e aumento nos
361 níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Harman e sua teoria dos radicais livres (1950)
362 (Harman, 2003) descreveram o mecanismo basal do envelhecimento como resultado do
363 acúmulo de EROs, provenientes do metabolismo celular, estando relacionado a uma
364 diminuição da expectativa de vida. Estudos recentes evidenciam que processos adicionais,
365 incluindo o acúmulo de Fe, desempenham papel crucial na aceleração do envelhecimento
366 (Jenkins et al., 2020a; Landis et al., 2020).

367 O Fe é um micronutriente vital em diversos processos biológicos, como respiração
368 celular, produção de energia, síntese de DNA, ecdisona, lipídios e metabolismo da dopamina.
369 Alterações em seu mecanismo regulatório, resultando em acúmulo ou deficiência, podem ter
370 consequências devastadoras (Mazhar et al., 2021). Em excesso, seja pelo acúmulo natural
371 decorrente do envelhecimento ou por um excesso de suplementação, o Fe pode interagir com
372 peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando radicais hidroxila ($OH\bullet$) pela reação de Fenton,
373 causando dano oxidativo crítico às biomoléculas e associado ao surgimento de doenças como
374 câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Larric et al., 2020;
375 Skoupilová et al., 2018).

376 A ferroptose, uma forma de morte celular dependente de Fe, compreende estágios
377 como esgotamento de glutathiona (GSH) e/ou da enzima glutathiona peroxidase 4 (GPx4),
378 aumento do Fe intracelular, produção excessiva de EROs e peroxidação lipídica.
379 Características da ferroptose incluem produtos finais tóxicos da peroxidação lipídica, como 4-
380 hidroxinonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA), moléculas mutagênicas e citotóxicas. Na
381 ferroptose, a morte celular ocorre devido à peroxidação lipídica dependente de Fe, causada
382 por uma produção aumentada de EROs, via Reação de Fenton (Dixon and Pratt, 2023; Hu et
383 al., 2023; Larric et al., 2020). É sabido que o desequilíbrio entre a produção de EROs e os
384 mecanismos antioxidantes do organismo resulta em estresse oxidativo, culminando em danos
385 celulares e contribuindo para doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Huntington e
386 Parkinson (Forman and Zhang, 2021).

387 Uma diminuição nas defesas antioxidantes dependentes de GSH contribui para a
388 ferroptose uma vez que compromete a atividade da hidroperoxidases dependente de GSH, que
389 converte peróxidos lipídicos em álcoois lipídicos não tóxicos (Ursini and Maiorino, 2020).
390 GSH, o tiol celular mais abundante, atua como antioxidante endógeno, desempenhando papéis

391 importantes na homeostase do Fe, detecção e regulação do Fe, tráfego de Fe e biossíntese do
392 cofator de Fe. Níveis de GSH diminuem naturalmente com a idade (Jenkins et al., 2020a). A
393 enzima GPx4 tem papel crucial na proteção celular contra a ferroptose, removendo produtos
394 tóxicos da peroxidação lipídica induzida por Fe e prevenindo a depleção de GSH. A
395 diminuição nos níveis de GPX4 contribui para a ferroptose (Ursini and Maiorino, 2020a).

396 *Drosophila melanogaster*, organismo que têm contribuído significativamente para
397 estudos sobre os mecanismos que influenciam o declínio funcional relacionado à idade,
398 apresentam semelhanças comportamentais e bioquímicas com vertebrados (Piper and
399 Partridge, 2018; Sun et al., 2013a). O envelhecimento em moscas reflete-se em um prejuízo
400 na locomoção, respostas sensório-motoras, comportamento reprodutivo e funções cognitivas,
401 além de declínios geral relacionados à idade nas funções fisiológicas (Brenman-Suttner et al.,
402 2020; Jones and Grotewiel, 2011). Drosófilas podem ser consideradas um organismo
403 adequado ao estudo do envelhecimento tendo em vista o seu curto ciclo de vida possibilitando
404 estudar fatores que interferem na expectativa de vida e homeostase de Fe (Mollá-Albaladejo
405 and Sánchez-Alcañiz, 2021; Tolwinski, 2017). A contribuição deste modelo para o
406 envelhecimento pode ser constatada em uma série de estudos presentes na literatura (Jones
407 and Grotewiel, 2011; Piper and Partridge, 2018; Sun et al., 2013a).

408 No presente estudo, avaliamos as mudanças comportamentais e bioquímicas, dano
409 oxidativo e o papel do antioxidante GSH nos danos induzidos pelo envelhecimento natural em
410 machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster*.

411

412 **2. Revisão da literatura**

413

414 **2.1 Envelhecimento**

415

416 No envelhecimento, um fenômeno inevitável à vida dos seres vivos, é um processo
417 multifacetado que ocorre com o simples transcorrer do tempo, englobando uma gama de
418 mudanças fisiológicas e comportamentais (Debès et al., 2023; Tsurumi and Li, 2020). À
419 medida que os organismos envelhecem, essas alterações permeiam diversos sistemas
420 essenciais, como o nervoso, motor e metabólico, estabelecendo uma complexa interação entre
421 o envelhecimento e a funcionalidade desses sistemas (López-Otín et al., 2023; Piper and
422 Partridge, 2018).

423 No âmbito celular, o envelhecimento se manifesta por meio de uma série de eventos
424 marcantes, cada qual contribuindo para a progressiva deterioração das funções biológicas.

425 Este cenário inclui a perda de integridade do DNA, um componente central no controle
426 genético da célula, bem como a perda neuronal, um aspecto crucial relacionado às funções
427 cognitivas e motoras (Li et al., 2021a). As deficiências motoras, por sua vez, compõem um
428 espectro amplo de alterações que influenciam diretamente na mobilidade e coordenação dos
429 organismos idosos (Hiew et al., 2023).

430 Paralelamente, as mudanças metabólicas durante o envelhecimento desencadeiam uma
431 reconfiguração nos processos bioquímicos, afetando a forma como os organismos processam
432 nutrientes e geram energia (Palmer and Jensen, 2022a). O acúmulo de danos celulares,
433 resultante de um desequilíbrio no reparo e na renovação celular, adiciona outra camada de
434 complexidade ao envelhecimento, contribuindo para a perda progressiva da homeostase
435 (Palmer and Jensen, 2022b; Song et al., 2020).

436 A senescência celular, caracterizada pela parada irreversível do ciclo celular, e a
437 disfunção mitocondrial, associada à redução na produção de energia e ao aumento na geração
438 de EROs são fatores intrínsecos ao envelhecimento celular. Esses elementos, quando vistos
439 em conjunto, delineiam um cenário abrangente do envelhecimento, destacando sua natureza
440 multifacetada e a necessidade de compreensão detalhada para desenvolver estratégias eficazes
441 de intervenção (Song et al., 2020).

442 No envelhecimento, há um declínio gradual das funções fisiológicas do organismo.
443 Isso pode envolver sistemas como o cardiovascular, respiratório, imunológico e endócrino
444 (Flint and Tadi, 2023a). Observa-se também perda de massa muscular e óssea, o que contribui
445 para a fragilidade e risco aumentado de quedas (Hiew et al., 2023). O envelhecimento muitas
446 vezes está associado ao declínio cognitivo, incluindo problemas de memória, atenção e
447 velocidade de processamento mental. Em casos mais graves, isso pode levar ao
448 desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Flint and
449 Tadi, 2023b; Yang et al., 2023). Além disso o metabolismo do corpo pode ser afetado pelo
450 envelhecimento, levando a questões como ganho de peso, resistência à insulina e mudanças
451 nas necessidades nutricionais (Palmer and Jensen, 2022b; Song et al., 2020).

452 Dentre as teorias do envelhecimento, a teoria dos radicais livres, fundamentada por
453 Harman em (1950) constitui um marco significativo na compreensão dos processos
454 subjacentes ao envelhecimento. Esta teoria destaca o papel preponderante das EROs,
455 originadas principalmente do metabolismo celular, como agentes causadores do
456 envelhecimento (Harman, 2003). Recentemente, pesquisas têm ampliado esse cenário,
457 evidenciando que outros elementos como o acúmulo de Fe, desempenham funções cruciais no
458 processo de aceleração do envelhecimento (Jenkins et al., 2020; Mazhar et al., 2021).

459

460 2.2 Ferro e o envelhecimento

461

462 O Fe proveniente da dieta pode ser encontrado em formas heme (Fe^{2+}), derivadas de
463 fontes animais, e não heme (Fe^{3+}), presentes em fontes vegetais. E em sistemas biológicos o
464 Fe existe nas formas ferrosa reduzida (Fe^{2+}) e férrica oxidada (Fe^{3+}), a transição entre esses
465 estados de oxidação é um aspecto essencial da homeostase do Fe. Alterações em seu
466 mecanismo regulatório, resultando em acúmulo ou deficiência, são prejudiciais ao organismo
467 (Mazhar et al., 2021; Zeidan et al., 2021).

468 O acúmulo de Fe, em particular, surge como um componente adicional que pode
469 acentuar o desequilíbrio redox e acelerar os eventos relacionados ao envelhecimento. Estudos
470 recentes apontam para a complexidade desses mecanismos, destacando a interação entre o Fe
471 e as EROs como um catalisador adicional do estresse oxidativo, perpetuando danos celulares
472 e contribuindo para a deterioração dos processos biológicos fundamentais (Mazhar et al.,
473 2021; Skoupilová et al., 2018). O complexo equilíbrio dos níveis fisiológicos de Fe e a
474 adequada manutenção da homeostase do Fe desempenham um papel crucial no apoio a um
475 envelhecimento saudável. O estresse oxidativo desencadeado pelo Fe pode está associado a
476 condições patológicas relacionadas à idade, e é reconhecido como um dos principais
477 elementos que contribuem para o processo de envelhecimento em seres humanos (Zeidan et
478 al., 2021), em *Drosophila melanogaster* (Massie et al., 1985) e *C. elegans* (Larric et al.,
479 2020).

480 O acúmulo de Fe associado ao envelhecimento pode manifestar-se em várias formas,
481 como Fe lábil, participante da lipofuscina, ligados a ferritina, entre outras. Foi demonstrado
482 que os níveis de ferritina aumentam com o avanço da idade podendo contribuir com o
483 fenômeno do sequestro de Fe celular associado ao envelhecimento (Goldhaber et al., 2020;
484 Zeidan et al., 2021). Estudos demonstraram que as células senescentes podem apresentar uma
485 concentração de Fe dez vezes aumentada em comparação com as células mais jovens (Killilea
486 et al., 2003). Além disso um aumento nos níveis de ferritina celular é reconhecido como um
487 biomarcador de envelhecimento celular e senescência (Liu et al., 2019). Aumentada expressão
488 da ferritina foi observada no cérebro de drosófilas adultas, com acúmulo de ferro e
489 holoferritina durante o processo de envelhecimento (Jacomín et al., 2019). No contexto das
490 doenças neurodegenerativas, surge a questão crucial sobre se os acúmulos de metais
491 desencadeiam essas condições ou se é a presença da doença durante o envelhecimento que
492 desregula o metabolismo de metais, como o Fe. O entendimento do mecanismo primário

493 ainda é objeto de investigação (Jacomin et al., 2019; Ward et al., 2014).

494 Entender a interconexão entre EROs, acúmulo de Fe, envelhecimento e doenças
495 associadas proporciona uma visão mais abrangente dos eventos que desencadeiam o
496 envelhecimento celular. Este entendimento não só revela os detalhes complicados desse
497 processo complexo, mas também estabelece bases sólidas para o desenvolvimento de
498 estratégias inovadoras de intervenção (Ying et al., 2021). A procura por tratamentos ou
499 estratégias destinadas a ajustar esses processos torna-se essencial diante do aumento da
500 população idosa e das implicações socioeconômicas relacionadas a condições associadas à
501 idade (Li et al., 2021). Portanto, investigar a relação entre EROs, acúmulo de Fe e
502 envelhecimento não apenas amplia nosso conhecimento científico, mas também destaca
503 possíveis abordagens promissoras para fomentar um envelhecimento saudável e atenuar os
504 impactos adversos desse processo inevitável.

505

506

507 **2.3 Ferroptose**

508

509 O crescente interesse e as pesquisas relacionadas à ferroptose nos últimos anos
510 refletem um cenário de constante evolução desde a cunhagem do termo em 2012 (Dixon et al.,
511 2012). Essa forma distinta de morte celular, dependente de Fe, destaca-se pela sua vinculação
512 ao acúmulo desregulado de Fe e ao subsequente estresse oxidativo, estabelecendo uma
513 diferenciação significativa em relação a outras modalidades de morte celular, como apoptose
514 ou necrose. O mecanismo central da ferroptose envolve a perda da homeostase do Fe,
515 desencadeando a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, danos às membranas celulares,
516 culminando no colapso e na morte celular (Galaris et al., 2019; Toyokuni et al., 2020).

517 O desencadeamento da ferroptose ocorre por meio de eventos específicos, como a
518 depleção do antioxidante intracelular GSH e/ou da enzima GPx4. Isso resulta no aumento dos
519 níveis de Fe intracelular, desencadeando a reação de Fenton, em que o Fe interage com H₂O₂,
520 gerando EROs, como o OH•. As EROs, por sua vez, iniciam a peroxidação lipídica, gerando
521 compostos tóxicos, 4-HNE e MDA, destruindo as membranas e acarretando a morte celular
522 (Jenkins et al., 2020b).

523 A GSH, um tripeptídeo composto pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e
524 glicina, desempenha um papel crucial na prevenção da ferroptose (Homma et al., 2020; Zhang
525 et al., 2023). A GSH atua como um antioxidante essencial na proteção das células contra a
526 ferroptose por meio de diversos mecanismos, como a neutralização EROs a partir da sua
527 atividade antioxidante, incluindo a neutralização de radicais livres produzidos durante a

528 peroxidação lipídica (Miess et al., 2018) e a coatividade com enzimas antioxidantes atuando
529 como cofator de enzimas antioxidantes, como a GPx4, que auxilia na remoção eficaz de
530 EROs e peróxidos lipídicos (Liu et al., 2023). Além disso a GSH também pode estar
531 envolvida na regulação do transporte e armazenamento de Fe, cujas alterações podem afetar o
532 equilíbrio redox intracelular (Berndt and Lillig, 2017b). Nesse viés, a depleção de GSH ou sua
533 inativação pode aumentar a susceptibilidade das células à ferroptose (Hu et al., 2023; Ursini
534 and Maiorino, 2020b) (Figura 2).

535 A peroxidação lipídica desempenha um papel central na ferroptose, caracterizada pelo
536 acúmulo letal de peróxidos lipídicos. Neste contexto, ocorre um acúmulo descontrolado de Fe
537 intracelular, muitas vezes devido à regulação inadequada das proteínas que controlam o
538 transporte e armazenamento de Fe. O Fe livre participa de reações de Fenton, gerando radicais
539 livres, especialmente o OH•, altamente reativo com biomoléculas (Mazhar et al., 2021; Yang
540 and Stockwell, 2016). Esses radicais atacam ácidos graxos insaturados nas membranas
541 celulares, resultando na formação de peróxidos lipídicos e desencadeando a peroxidação
542 lipídica. Essas moléculas instáveis causam danos significativos às membranas celulares,
543 comprometendo sua integridade estrutural, o que leva a falhas na função e aumento da
544 permeabilidade. Esse cenário acarreta no extravasamento de íons e moléculas essenciais das
545 células, contribuindo para o processo irreversível de morte celular do tipo ferroptose
546 (Latunde-Dada, 2017; Li et al., 2022).

547 A relevância da ferroptose abrange diversas condições patológicas, incluindo câncer,
548 doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Estudos sobre esse fenômeno foram
549 conduzidos em uma variedade de modelos experimentais, desde culturas celulares até
550 organismos modelo, como o *Caenorhabditis elegans*, visando não apenas a compreensão dos
551 mecanismos subjacentes, mas também a exploração de estratégias terapêuticas potenciais (Hu
552 et al., 2023; Larric et al., 2020; Murray et al., 2023).

553 Existem ferramentas para estudo da ferroptose, que são compostos conhecidos como
554 bloqueadores ou indutores de ferroptose. No caso dos bloqueadores da ferroptose como a
555 ferrostatina, liproxstatina e deferoxamina são compostos que atuam bloqueando a ferroptose
556 em diferentes vias de mecanismos. A deferoxamina e ferrostatina atuam como um quelante de
557 Fe que se liga ao Fe livre, evitando sua participação em reações de Fenton, que são cruciais
558 para a ferroptose. Enquanto a liproxstatina atua bloqueando a peroxidação lipídica (Du and
559 Guo, 2022; Jenkins et al., 2020b; Larric et al., 2020).

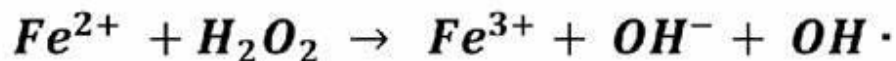
560 Para desencadear a ferroptose, alguns compostos são reconhecidos, incluindo a
561 Erastina, *RAS-selective lethal* (RSL3) e o dietil maleato (DEM). A Erastina age induzindo a

562 ferroptose através do bloqueio da atividade da proteína antiapoptótica Bcl-2. O RSL3, por sua
 563 vez, é um inibidor seletivo da enzima GPx4, resultando no acúmulo de peróxidos lipídicos e
 564 na promoção da ferroptose. Já o DEM induz a ferroptose por meio da depleção da GSH, a
 565 qual desempenha um papel crucial na homeostase do Fe e no organismo (Du and Guo, 2022;
 566 Gartzke et al., 2023; Jenkins et al., 2020b). A redução dos níveis de GSH resulta no acúmulo
 567 de Fe lábil. Esse Fe reage com o H₂O₂, desencadeando a reação de Fenton, que por sua vez
 568 gera radicais livres. Esses radicais livres induzem a peroxidação lipídica, culminando, por
 569 fim, na morte celular conhecida como ferroptose (Sun et al., 2018), (Figura 2).

570 A compreensão da ferroptose está em constante evolução, e pesquisas contínuas nesse
 571 campo têm o potencial de aprofundar não apenas o entendimento dos mecanismos
 572 moleculares envolvidos, mas também de identificar alvos terapêuticos para condições
 573 associadas a esse processo celular específico. A complexidade dessa forma de morte celular
 574 destaca a importância de estudos futuros, proporcionando novas perspectivas no campo da
 575 medicina e tratamento de doenças (Sun et al., 2023).

576

577 **Figura 1:** Esquema representativo da reação de Fenton. Ferro ferroso (Fe²⁺) reagindo com
 578 peróxido de hidrogênio (H₂O₂) tendo como produto da reação o ferro férrico (Fe³⁺) e do
 579 radical hidroxila (OH•).



580

581 Fonte: <https://acesse.dev/ROTxv>

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

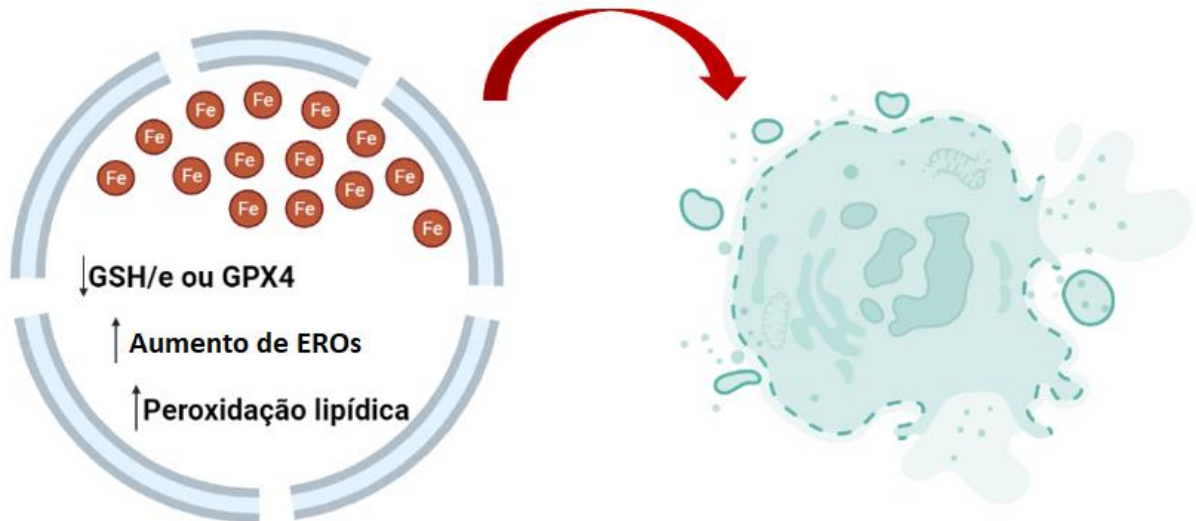
592

593

594

595 **Figura 2:** Esquema representativo dos mecanismos bioquímicos envolvidos na Ferroptose.

596 Ferro (Fe), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase 4 (GPX4), espécies reativas de
 597 oxigênio (EROs).



598

599 Fonte: Criado no Biorender (<https://www.biorender.com/>)

600

601 **2.4 Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante**

602

603 Os radicais livres são moléculas instáveis, oxidantes e altamente reativas,
 604 caracterizadas por apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada
 605 eletrônica, conferindo-lhes uma meia-vida curta (Nakai and Tsuruta, 2021). Dentro desse
 606 grupo de moléculas, incluem-se as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). No
 607 âmbito das EROs, merecem destaque os radicais superóxido ($O_2\bullet$), hidroxila ($OH\bullet$) e peróxido
 608 de hidrogênio (H_2O_2). Já entre as ERNs, o peroxinitrito ($ONOO^-$) sobressai como o agente
 609 mais prejudicial (Sharma et al., 2018; Steinhorn and Lakshminrusimha, 2020).

610 O processo natural de geração de EROs desempenha um papel essencial na
 611 manutenção das funções fisiológicas do organismo, contribuindo para a defesa contra
 612 infecções. No entanto, quando esses radicais são produzidos em excesso, podem causar danos
 613 a moléculas vitais, como o DNA, proteínas e lipídios resultante da oxidação das biomoléculas,
 614 peroxidação lipídica e levando inclusive à perda da atividade enzimática (Rambabu et al.,
 615 2019).

616 Quando há um desequilíbrio entre a geração de radicais e essa capacidade
 617 antioxidante, configura-se um estado conhecido como estresse oxidativo (Mehrabani et al.,
 618 2020). O organismo possui uma sistema antioxidante que tem a função de combater, reduzir,
 619 inibir ou eliminar as EROs e ERNs bem como seus danos, estabilizando estas moléculas por

620 meio de moléculas doadoras de elétrons. O sistema de defesa antioxidante celular se divide
621 em componentes endógenos e exógenos, sendo os endógenos compostos por enzimas
622 superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-
623 transferase (GST), e os não enzimáticos, como o tripeptídeo glutathione (GSH) (Tatar and
624 Türkmenoğlu, 2020). Os exógenos são adquiridos externamente e originam-se de diversas
625 substâncias antioxidantes, tais como uma dieta abundante em vitaminas. Estes desempenham
626 um papel crucial no combate a doenças associadas ao acúmulo de radicais livres, integrando-
627 se à capacidade endógena do organismo em combater esses radicais (Barra et al., 2010;
628 Rambabu et al., 2019).

629 A GSH destaca-se como um tiol amplamente presente nas células, caracterizado por
630 sua baixa massa molecular e pelo radical sulfidrílico (SH), conferindo-lhe uma excepcional
631 capacidade redutora como doador eficaz de elétrons. Durante o processo de detoxificação de
632 xenobióticos no organismo, a GSH sofre oxidação, transformando-se em glutathione oxidada
633 (GSSG), sob a influência da enzima glutathione peroxidase. Posteriormente, a GSSG é
634 reduzida novamente à forma ativa de GSH, mediada pela enzima glutathione reductase. Esse
635 ciclo desempenha um papel essencial na manutenção do equilíbrio redox, assegurando que a
636 glutathione mantenha sua função protetora e desempenhe um papel fundamental no sistema de
637 defesa enzimático (Barra et al., 2010; Gonzalez, 2020; Tatar and Türkmenoğlu, 2020).

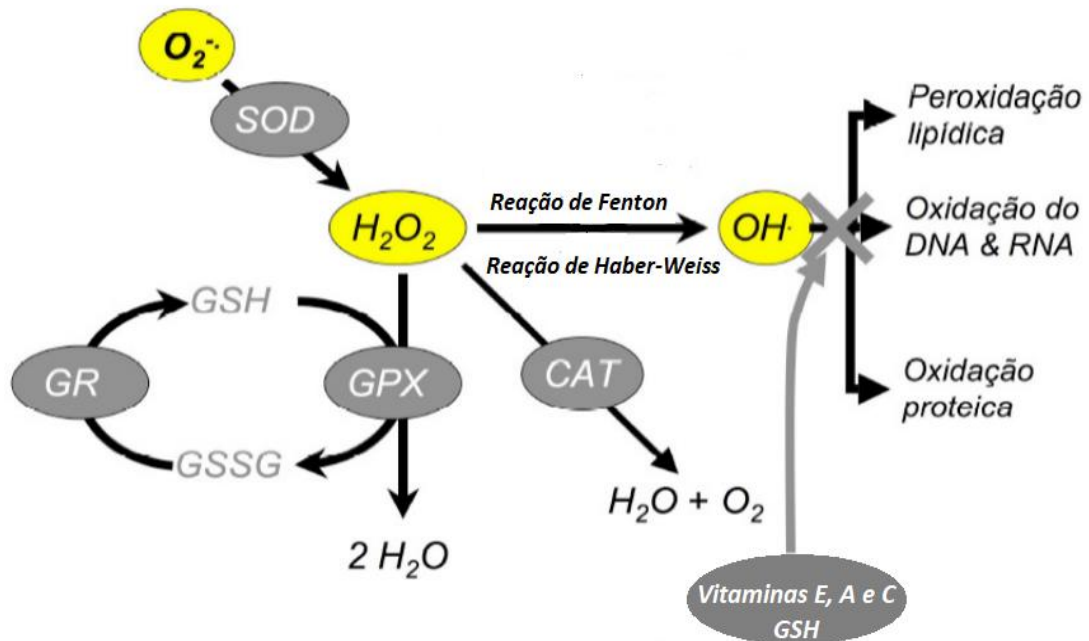
638 Dentre as enzimas, a GST desempenha um papel crucial ao catalisar a conjugação da
639 GSH a compostos tanto exógenos quanto endógenos. Este processo contribui
640 significativamente para a detoxificação do organismo, facilitando a excreção dessas
641 substâncias. Paralelamente, SOD realiza a catalisação da dismutação do radical superóxido
642 (O_2^\bullet) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é normalmente gerado durante os processos
643 oxidativos em organismos aeróbicos. Após a formação do H_2O_2 , a CAT intervém para
644 decompor essa molécula em O_2 e H_2O . Vale ressaltar que o sistema GPx também desempenha
645 um papel relevante ao neutralizar o H_2O_2 , adicionando o substrato glutathione (Steinhorn and
646 Lakshminrusimha, 2020; Tatar and Türkmenoğlu, 2020). Contudo, na eventualidade da falha
647 na detoxificação do H_2O_2 , pode ocorrer a geração do radical OH^\bullet por meio das reações de
648 Fenton e de Haber-Weiss (Figura 3). Este radical é conhecido por sua elevada reatividade e
649 instabilidade, não havendo um sistema enzimático de defesa direcionado a ele (Barbosa et al.,
650 2010).

651

652

653 **Figura 3:** Esquema representativo do sistema de defesas antioxidantes enzimáticos. Radical

654 superóxido ($O_2^{\bullet-}$), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalase
 655 (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa oxidada (GSSG), glutationa redutase (GR),
 656 glutationa reduzida (GSH), radical hidroxila OH^{\bullet} , oxigênio (O_2), água (H_2O).



657

658 Fonte: Adaptado de Moura; Rodrigues- Willan (2011)

659

660 2.5 *Drosophila melanogaster* como modelo para envelhecimento

661

662 *Drosophila melanogaster* é um inseto da ordem Diptera e da família Drosophilidae,
 663 comumente conhecido como "mosca da fruta". Os insetos exibem características notáveis e
 664 singulares, além de apresentares respostas comportamentais e bioquímicas comparável a de
 665 roedores quando expostos a compostos tóxicos e situações de estresse. São facilmente
 666 manipuláveis e observáveis, apresentam crescimento, dimorfismo sexual evidente, com
 667 fêmeas apresentando tamanho corporal superior ao dos machos (Figura 4), reprodução rápida,
 668 metaformose completa (Figura 5) e e uma significativa homologia de 75% de seus genes
 669 relacionados a doenças com os genes humanos (Pandey and Nichols, 2011; Ugur et al., 2016).
 670 Importante destacar que sua utilização não requer aprovação de comitês de ética (Moraes and
 671 Montagne, 2021; Scully and Bidochka, 2006).

672 A *Drosophila melanogaster* é um organismo que contribui em estudos que envolvam
 673 o envelhecimento, foram identificados algumas alterações moleculares que podem refletir
 674 alterações moleculares sistêmicas que causam patologias relacionadas à idade. Isso inclui
 675 carbonilação de proteínas (He and Jasper, 2014; Wang et al., 2003), peroxidação lipídica

676 (Zheng et al., 2005) e agregação de proteínas (Demontis and Perrimon, 2010). O declínio no
677 desempenho cardíaco relacionado à idade, conhecido como envelhecimento cardíaco, foi
678 caracterizado na mosca da fruta (Nishimura et al., 2011; Ocorr et al., 2007). O declínio
679 funcional, metabólico e estrutural do músculo esquelético é um fenômeno associado ao
680 envelhecimento na mosca da fruta (Demontis and Perrimon, 2010; He and Jasper, 2014).
681 Além disso o envelhecimento do cérebro da *Drosophila* também foi relatado (He and Jasper,
682 2014).

683 *Drosophila* também tem sido implicada em estudos que mostram os mecanismos que
684 influenciam o declínio funcional relacionado à idade (Tsurumi and Li, 2020), ela apresenta
685 semelhanças comportamentais e bioquímicas com vertebrados (Piper and Partridge, 2018; Sun
686 et al., 2013a). Estudos demonstraram que o envelhecimento em moscas provoca prejuízos no
687 comportamento, degeneração muscular, respostas sensorio-motoras, comportamento
688 reprodutivo e funções cognitivas, acompanhados por declínios relacionados à idade nas
689 funções fisiológicas (Brenman-Suttner et al., 2020; Chechenova et al., 2023; Jones and
690 Grotewiel, 2011). Além disso, o curto ciclo de vida dos insetos permite o estudo dos fatores
691 que interferem na expectativa de vida entre estes a homeostase de Fe (Mollá-Albaladejo and
692 Sánchez-Alcañiz, 2021; Tolwinski, 2017). Neste sentido, foi demonstrado acúmulo de Fe em
693 moscas da fruta durante o envelhecimento, no cérebro, intestino e em homogenato de mosca
694 (Jacomín et al., 2019; Massie et al., 1985; Tang and Zhou, 2013). Esse acúmulo de ferro tem
695 sido associado a doenças neurodegenerativas (Bekenstein and Kadener, 2011). Adicional a
696 isso, é relatado que a inibição de absorção de ferro prolonga a expectativa de vida da
697 *Drosophila melanogaster* (Massie et al., 1993).

698 Essas investigações ofereceram valiosas perspectivas sobre os mecanismos
699 subjacentes ao envelhecimento, proporcionando *insights* e informações relevantes para
700 estudos sobre os efeitos do envelhecimento e para o desenvolvimento de estratégias potenciais
701 de modulação desse processo (Jones and Grotewiel, 2011; Piper and Partridge, 2018; Sun et
702 al., 2013a). Isso ressalta a importância da drosófila em pesquisas relacionadas ao
703 envelhecimento (Sun et al., 2013).

704

705

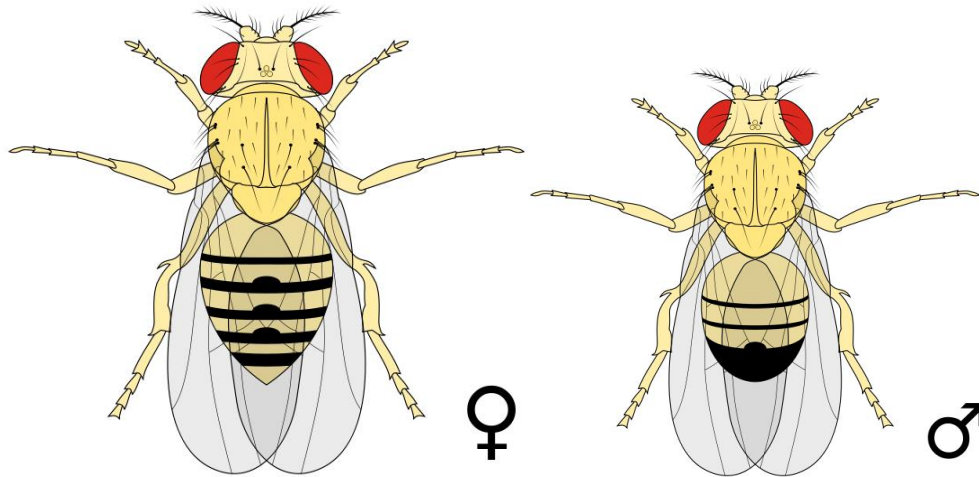
706

707

708

709 **Figura 4:** Representação de fêmea e macho de *Drosophila melanogaster*.

710

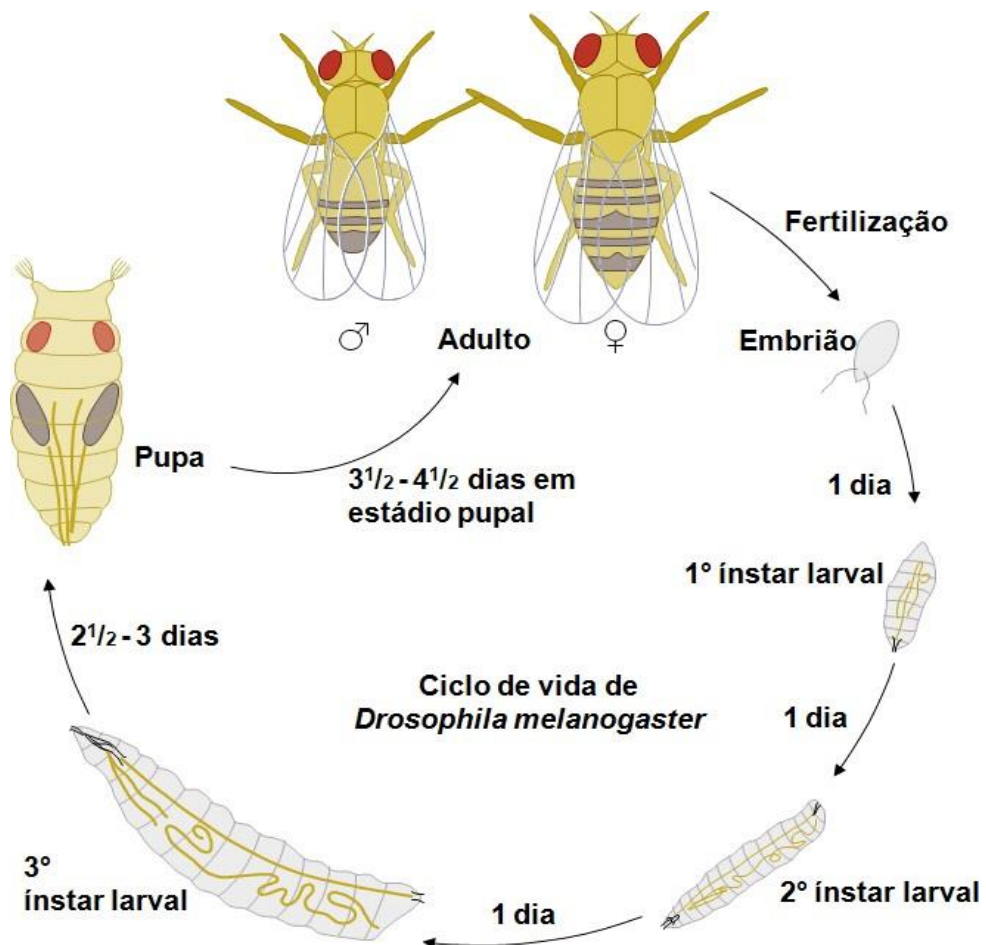


711

712

713 Fonte: Adaptado de Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

714

715 **Figura 5:** Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*.

716

717 Fonte: Adaptado de Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc.

718 **3. Objetivos**

719

720 **3.1 Objetivo geral**

721

722 O objetivo geral do presente trabalho foi investigar o envolvimento de mecanismos
723 preditivos de ferroptose nas alterações locomotoras e bioquímicas associados ao
724 envelhecimento de *Drosophila melanogaster*.

725

726 **3.2 Objetivos específicos**

727 Os objetivos específicos deste trabalho basearam-se em, utilizando o modelo de
728 estudo da *Drosophila melanogaster*.

729 Avaliar a sobrevivência, desempenho locomotor e equilíbrio de machos e fêmeas de
730 *D. melanogaster* ao longo do envelhecimento e escolher um período de tempo onde os danos
731 comportamentais associados ao envelhecimentos sejam mais proeminentes;

732 Determinar o estado estável redox e níveis de GSH em machos e fêmeas jovens e
733 envelhecidas;

734 Analisar a viabilidade celular de machos e fêmeas jovens e envelhecidas;

735 Quantificar os níveis de Fe sérico presente na hemolinfa de machos e fêmeas jovens e
736 envelhecidas;

737 Analisar a peroxidação lipídica de machos e fêmeas jovens e envelhecidas;

738 Avaliar os efeitos da depleção da GSH com utilização do composto DEM sobre a
739 locomoção e níveis de GSH em machos e fêmeas jovens e envelhecidas.

740

741

742 **4. Resultados**

743

744 Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os
745 itens Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se
746 no manuscrito, o qual está publicado no periódico *Oxidative Medicine and Cellular*
747 *Longevity*, ISSN: 1942-0994.










748

749

750

Research Article

Increased Iron Levels and Oxidative Stress Mediate Age-Related Impairments in Male and Female *Drosophila melanogaster*

Karen Kich Gomes ¹, Ana Beatriz dos Santos ¹, Jaciana Sousa dos Anjos ¹,
Luana Paganotto Leandro ², Maria Takemura Mariano ¹, Felipe Lima Pinheiro ³,
Marcelo Farina ⁴, Jeferson Luis Franco ^{1,2} and Thais Posser ¹

¹Oxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Interdisciplinary Research Center on Biotechnology-CIPBIOTEC, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, RS, Brazil

²Department of Chemistry, Post Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

³Paleontology Laboratory, Federal University of Pampa, Campus São Gabriel, RS, Brazil

⁴Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, 88040-900 Santa Catarina, Brazil

Correspondence should be addressed to Thais Posser; thaisposser@unipampa.edu.br

Received 29 December 2022; Revised 27 April 2023; Accepted 25 May 2023; Published 9 June 2023

Academic Editor: Grzegorz Węgrzyn

Copyright © 2023 Karen Kich Gomes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

751

752

753 **Abstract:**

754 Aging is characterized by a functional decline in the physiological functions and organic
755 systems causing frailty, illness, and, finally death. Ferroptosis is as Iron (Fe) -dependent
756 regulated cell death, which has been implicated in the pathogenesis of several disorders, such
757 as cardiovascular and neurological diseases. In the present study, it was investigated
758 behavioral and oxidative stress parameters over the aging of *Drosophila melanogaster* that
759 together with augmented Fe levels, indicate the occurrence of ferroptosis. Our work
760 demonstrated that flies older flies (30-days-old) of both sexes presented impaired locomotion
761 and balance when compared with younger flies (5-days-old). Older flies also presented higher
762 reactive oxygen species (ROS) levels production, decreased glutathione levels (GSH), and
763 increased lipid peroxidation. In parallel, Fe levels were augmented in the fly's hemolymph.

764 The GSH depletor diethyl maleate potentiated the behavioral damage associated with age. Our
765 data demonstrated biochemical effects that characterize the occurrence of ferroptosis over the
766 age of *D. melanogaster*, and reports the involvement of GSH in the age-associated damages,
767 which could be in part attributed to the augmented levels of Fe.

768

769 **Keywords:** Fruit flies; Behavior, Aging; Fe; GSH; ROS; Lipid peroxidation; Ferroptosis.

770

771 **1. Introduction**

772 The aging process is physiological event commonly associated with neuronal loss,
773 motor disabilities, metabolism alterations, cellular senescence, augmented reactive oxygen
774 species (ROS) levels, lipid peroxidation, fragility, and increased susceptibility to diseases [1–
775 3]. Denham Harman and his theory of free radicals (1950), described the basal mechanism of
776 aging as a result of the accumulation of ROS, produced as by-products of cellular metabolism
777 and decreasing lifespan [4,5]. More recent studies demonstrated that additional processes
778 including Iron (Fe) accumulation are key players in accelerating aging [6].

779 Fe is an important metal that participates in several biological processes in eukaryotes,
780 including cell respiration and energy production, DNA synthesis, ecdysone, lipids and
781 dopamine metabolism [7,8]. Considering the importance of this metal, alterations in its
782 regulatory mechanism causing its accumulation or deficiency can have devastating
783 consequences [9,10]. When in excess, Fe can interact with hydrogen peroxide (H₂O₂)
784 generating hydroxyl radicals (OH[°]) through the Fenton reaction, which plays critical
785 oxidative damage to biomolecules and is associated with the onset of diseases like cancer,
786 diabetes, neurodegenerative and cardiovascular diseases [7,10,11].

787 Ferroptosis is an Fe-dependent cell death composed of four main stages: depletion of
788 GSH and/or GPx4, increase in intracellular Fe, excessive production of ROS, and lipid

789 peroxidation [12,13,14]. Characteristics of ferroptosis include the toxic end products of lipid
790 peroxidation, 4-hydroxynonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA), which are mutagenic
791 and cytotoxic molecules [14]. In ferroptosis, cell death occurs due to Fe-dependent lipid
792 peroxidation caused by an augmented ROS production, [15] via Fenton Reaction. A decrease
793 in GSH-dependent antioxidant defenses also contributes to the ferroptosis process, since
794 compromises the activity of GSH-dependent hydroperoxidase that converts lipid peroxides
795 into non-toxic lipid alcohols [12,16,17].

796 GSH is the most abundant cellular thiol in living beings, acting as a potent endogenous
797 antioxidant. It plays important roles in Fe homeostasis, acting in Fe sensing and regulation, Fe
798 trafficking, and Fe cofactor biosynthesis. Many GSH reactions involve the highly polarizable
799 sulfhydryl (SH) group, making it a good nucleophile for reactions with electrophilic chemical
800 compounds [10,18]. It has been reported that GSH levels are naturally decreased over age
801 [19]. The enzyme glutathione peroxidase 4 (GPx4) plays a crucial role in protecting cells
802 against ferroptosis by removing toxic products of Fe-induced lipid peroxidation and
803 preventing GSH depletion. A decrease in Glutathione peroxidase 4 (GPx4) levels contributes
804 to ferroptosis [15, 19].

805 The organism *Drosophila melanogaster* has made significant contributions to studies
806 on the mechanisms that influence age-related functional declines. Furthermore, flies exhibit
807 behavioral and biochemical similarities with vertebrates. Studies have shown that aging
808 impairs the behavior, sensorimotor responses, reproductive behavior, and cognitive functions
809 of flies [20], as well as age-related declines in physiological functions [22]. Additionally, the
810 short life cycle of flies allows for the study of factors that could potentially interfere with life
811 expectancy [21] and metal homeostasis [23-27].

812 In this study, we assessed behavioral and biochemical changes, oxidative damage, and
813 the role of the antioxidant GSH in the damage induced by aging in *Drosophila melanogaster*.

814

815 **2. Material and Methods**

816 *2.1 Chemicals*

817 All the chemicals used in the study were purchased from Sigma – Aldrich e Labtest
818 (São Paulo, SP, Brazil).

819

820 *2.2 Drosophila stock and culture*

821 *Drosophila melanogaster* (Harwich lineage) was kept under controlled temperature at
822 (25° C) and humidity at (60-70%) in a light/dark cycle of 12 hours, cultivated in glass tubes
823 measuring 50 mm × 85 mm and containing 10 mL of standard medium (corn flour, salt, wheat
824 germ, powdered milk, sugar, soy flour, rye flour) supplemented with dry yeast. Nipagin[®] was
825 used as an antifungal agent as described by Gomes et al., 2020 [19].

826

827 *2.3 Experimental design*

828 The flies (3-days-old) were isolated and separated by sex and kept in a standard
829 medium for different periods for behavioral and biochemical analysis. The lifetime periods
830 chosen for analysis were based on an analysis of motor performance over the aging of flies
831 and considering the lifespan of flies in laboratory conditions. The time of life chosen for the
832 experiments was based on a survival curve that we performed (Fig. 1) and from the geotaxis
833 test performed at different ages (Fig. 2).

834

835 *2.4 Lifespan analysis*

836 For lifespan analysis, 50 flies female and 50 flies males separated per sex were placed
837 into vials containing 10 mL of standard food. Flies were transferred to fresh vials every 7
838 days. The number of dead flies was daily recorded.

839

840 *2.5 Locomotor analysis*

841 2.5.1 *Negative geotaxis*

842 The negative geotaxis test (climbing ability) was performed in accordance with Bland
843 et al., 2009 with some modifications [20] at 5 different ages (5, 10, 20, 30, 40, and 50 days of
844 life). For this purpose, 10 flies per group were anesthetized in ice and placed in vertical glass
845 tubes (length 25 cm, diameter 1.5 cm) closed with the respective lids. After 30 min of
846 recovery, the flies were tapped lightly on the bottom of the tube and the number of flies it
847 took to rise 6 cm in the glass column was recorded. The test was repeated 3 times with
848 intervals of 20 seconds each. Thirty flies were used per group (n = 30). All experiments were
849 performed in triplicate. This experiment was carried out 9 times totalizing 90 individuals per
850 group. Results were expressed in number of flies on the top.

851

852 2.5.2 *Footbridge test*

853 To carry out the footbridge test, we used Solidworks software to design models and
854 prototypes, which were then modeled in Blender. The resulting models were printed using
855 Acrylonitrile butadiene styrene (ABS) on a GTMax 3D Core A3 3D printer, following a
856 protocol with a primary layer height of 0.1 mm. This protocol was based on Wositz et al.,
857 2013, with some modifications [21]. The test consists of a 13 cm long and 0.5 cm wide
858 horizontal footbridge (see Supplementary material I). The experimental groups included 5-
859 days-old males, 5-days-old females, 30-days-old males, and 30-days-old females. The wings
860 of the flies were clipped three hours before the tests to prevent flight. Males and females were
861 analyzed separately, and individuals from each group crossed the footbridge test individually
862 for up to 60 seconds. The time taken by flies to complete the path was recorded. Four groups
863 of 20 flies of both sexes were analyzed. The results were expressed in seconds.

864

865

866 2.5.3 *Balance test*

867 To analyze the balance of flies at different life stages, we designed a platform using
868 Solidworks software (Supplementary material II) that was 3 cm in length and printed on a 3D
869 printer. This was done similarly to the previous catwalk test, following the method of Iliadi et
870 al. (2016) with modifications [22]. The platform had two bases marking the beginning and the
871 end of the walk, with a nylon thread (thickness 0.10 mm) crossing the platform. Flies of both
872 sexes were divided into four groups of 20 individuals. The time taken by each fly to cross the
873 line was evaluated for up to 60 seconds, and the time was recorded. The results were
874 expressed in seconds.

875

876 2.6 *Determination of Cellular viability and Arbitrary Steady-State ROS Levels*

877 A group of 20 flies 30-days-old (separated by sexes) and 20 flies with 5 days of life
878 (separated by sexes) were homogenized in 1 mL of mitochondrial isolation buffer (220 mM
879 mannitol, 68 mM sucrose, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 1% BSA) and centrifugation at 1000
880 \times g for 10 min (4°C). The supernatant enriched with mitochondria was used to determine cell
881 viability (Resazurin assay; 544 nm_{ex}/590 nm_{em}) and the ROS steady-state levels by using a
882 fluorescent dye 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; 485 nm_{ex}/530 nm_{em}). Assays
883 were performed according to previously described protocols [19]. For the resazurin assay, 5
884 replicates were performed in triplicate, and for the DCF-DA assay, 4 replicates were
885 performed in triplicate. Data were standardized by protein concentration and expressed in
886 percentage.

887

888 2.7 *Quantification of GSH levels*

889 GSH was measured according to Ellman (1959) [23] with minor modifications. 20
890 flies per group were homogenized in 1 mL of 0.5 M Tris/HCl pH 8.0 at 4°C. In the 96-well

891 plate, 50 μL of the supernatant, 190 μL of the buffer used to homogenize, and 10 μL of 5mM
892 DTNB was transferred and was left in the dark for 20 min and the reading was performed at
893 412 nm in a microplate reader (PerkinElmer- EnSpire 2300 Multilabel Reader). The assay
894 was repeated 7 times in triplicate.

895

896 2.8 *Lipid peroxidation*

897 20 whole flies of different ages were anesthetized in ice and placed in vertical glass
898 tubes (length 25 cm, diameter 1.5 cm) containing 600 μL of TBA (0.005 % in 20% trichloro
899 acetic acid – TCA) according to Sachett et al., 2020 [24], with some modifications (dilution of
900 TBA from 0.5 to 0.005%). In this test, no homogenization was performed. The flies were
901 incubated at 95°C for 60 minutes. The absorbance of samples was measured at 532 nm in a
902 microplate reader (PerkinElmer- EnSpire 2300 Multilabel Reader). The results were
903 expressed in absorbance and the experiments were repeated 7 times in triplicate.

904

905 2.9 *Quantification of hemolymph Fe levels*

906 For the extraction of the hemolymph, microtubes of 1.5 mL and 0.5 mL were used.
907 One was placed inside and the smaller tube was perforated. Then 40 flies were paralyzed on
908 ice, and the thorax was perforated and flies were placed into the 0.5 mL microtube and
909 centrifuged at 3000 x g for 20 minutes to drain the hemolymph into a 1.5 mL tube. A volume
910 of 1 μL of hemolymph was obtained. This volume was diluted in 29 μL of 10 mM phosphate
911 buffered saline (PBS) according with Herren et al., 2014 and Masson et al., 2021 [25,26]. Fe
912 levels were quantified in hemolymph using a colorimetric kit (Labtest®). The assay was based
913 in the dissociated of ferric ions (Fe^{3+}) from transferrin by the action of acidic pH buffer and
914 reduced to ferrous ions (Fe^{2+}) by the action of hydroxylamine. Upon addition of ferrozine, a
915 bright magenta complex was formed and absorbance was measured at 540 and 580 nm. The

916 Fe levels was expressed as mg/dL of hemolymph. The assay was performed at 5 times in
917 triplicate.

918

919 2.10 *Diethyl maleate (DEM) treatment and analysis*

920 To investigate the involvement of GSH in locomotor deficits associated with aging
921 with it was used diethyl maleate (DEM), a GSH depletor which complexes GSH decreasing
922 the available levels of this antioxidant. 50 flies per group with 5 days and 30- days-old male
923 and female flies were exposed to 1 mM DEM mixed with the medium for 24h. After, negative
924 geotaxis test and GSH levels were evaluated as describe above [27].

925

926 2.11 *Statistical analysis*

927 All data were submitted to normality test D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk and
928 Kolmogorov Smirnov. The parametric data were expressed as mean \pm standard error mean
929 (SEM) and were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test; and
930 nonparametric data were expressed as median interquartile range, analyzed by Kruskal-Wallis
931 followed by Dunn's *post-hoc* test. The results were considered statistically significant when p
932 ≤ 0.05 .

933

934 **3. Results**

935 3.1 *Differences in the lifespan of male and female flies*

936 We performed a survival curve to analyze the difference in life expectancy between
937 males and females. The curve indicated that the life expectancy of females was longer than
938 that of males (by approximately 20 days) (Fig. 1) (approximately 20 days) (Fig. 1).

939

940 3.2 *Aging impairs negative geotaxis of flies*

941 To assess whether climbing ability is affected by age, we performed the negative
942 geotaxis test on male and female flies at different ages. As shown in (Fig. 2), locomotor
943 deficits were observed in both male and female flies after 20 days of life, and these deficits
944 increased with age.

945

946 *3.3 Footbridge test showed that 30-days-old flies have a lower running than 5 day old*
947 *flies*

948 Taking into account the compromised climbing ability with age, we also analyzed other
949 parameters such as walking speed and balance. The walking speed was evaluated in the
950 footbridge test (Fig. 3). The group of 5-days-old males took an average of 6 seconds to cross
951 the 13 cm footbridge, while 5-days-old females took an average of 11 seconds. On the other
952 hand, 30-days-old males took an average of 12 seconds and 30-days-old females took an
953 average of 17 seconds.

954

955 *3.4 The flies balance is affected by aging flies*

956 Considering the detrimental effects of age on locomotor ability of flies, it was
957 evaluated the balance of young and old flies in both sexes. The group of 5-days-old males takes
958 an average of 2 seconds to cross the 3 cm line, while the 5-days-old females take an average of
959 3 seconds, and the group of 30-days-old males takes an average of 40 seconds to cross the line,
960 and 30-days-old females an average of 35 seconds (Fig. 4).

961

962 *3.5 Age decreases cell viability and induces ROS in flies*

963 After observing changes in behavioral assays, biochemical parameters associated with
964 the presence of ferroptosis, including cell viability and ROS levels in young and old flies of
965 both sexes were analyzed. The 30-days-old male group showed 4.3 times decline in

966 mitochondrial dehydrogenases activity compared to the 5-days-old male group, and the 30-
967 days-old female group a 2.5 times decline relative to the 5-days-old female group, represented
968 by the fluorescence of the compound resazurin (Fig. 5A). Respecting DCF-DA fluorescence,
969 for detecting ROS, the group of 30-days-old males was increased by 2.2 times and in 30-days-
970 old females by 2.3 times about their respective controls 5-days- old flies. In comparison
971 between male and female with 30-days-old, we observation that males different in decreased
972 cell viability in 2.6 times in comparison with 30-days-old female. The DCF-DA test we no
973 observation this difference (Fig. 5B).

974

975 3.6 *GSH levels are decreased in aged flies*

976 A hallmark of ferroptosis is a decrease in GSH levels, thus this parameter was
977 analyzed in young and old flies of both sexes. In the group of males with 30-days-old, a
978 decrease of 1.2 times in relation to the group of 5-days-old male and in 30-days-old female,
979 the decrease was of 1.6 times in the levels of GSH in relation to their respective controls (5-
980 days-old male of 5-days-old female) and comparing 30-days-old male with 30-days-old
981 females, we observed that males have 1.3 times more GSH than old females (Fig. 6A).

982

983 3.7 *Age induces lipid peroxidation in male and female aging flies*

984 Considering the increase in lipid peroxidation and lower levels of GSH, indicating
985 ferroptosis, an induction of lipid peroxidation was investigated. In this trial, we observed an
986 increase of 2 times and the group of 30-days-old females an increase of 1.5 times, both
987 compared to their respective controls (5-days-old males and females) and when comparing
988 30-days-old males and females, it was observed that males present a 1.3 times increase in
989 lipid peroxidation (Fig. 6B).

990

991 3.8 *Age increase Fe levels in flies hemolymph*

992 Ferroptosis is an iron-dependent cell death, thus the levels of this metal was evaluated
993 in the hemolymph of flies. Fe amount was evaluated in young and old flies of both sexes. It
994 was observed a 2 times increase in Fe content at 30-days-old male and female flies in
995 comparison with their respective controls (5-days-old males and 5-days-old females) (Fig.
996 6C).

997

998 3.9. *Diethyl maleate treatment causes mortality, decrease GSH levels and locomotor*
999 *performance in D. melanogaster*

1000 GSH prevents ferroptosis by blocking lipid peroxidation or by acting as a ligand for
1001 iron in the cytoplasm [13]. To investigate the involvement of GSH in the deleterious effects of
1002 aging on behavior and mortality, flies were exposed to DEM, a GSH depletor. The results
1003 showed that the DEM induced a decrease in the locomotor test of 3 times and 4.6 times in
1004 aged males and females in relation to the control (without DEM). Furthermore, a 1.5 times
1005 and 1.6 times decrease in GSH levels was observed in male and female aging flies (30 days)
1006 exposed to DEM compared to their respective controls (without DEM). Males 5-days-old flies
1007 presented a 1.2 times decrease in locomotor performance in negative geotaxis test when
1008 comparing to the group that was not exposed to DEM. Similar results were observed in
1009 females. Regarding GSH levels, a 1.2 times decrease was observed in 5-days-old males and a
1010 1.3 times decrease in 5-days-old females, both compared to their respective controls (5-days-
1011 old males and 5-days-old females without DEM) (Fig. 7). The treatment with DEM induced a
1012 2.5 times increase in the mortality of male and female aging flies.

1013

1014

1015 **4. Discussion**

1016 Aging comprises natural physiological changes that occur in the organisms over time
1017 including progressive decline of locomotor and cognitive functions. Multiple events from
1018 molecular levels to organ systems mediate the aging process. The cumulative damage caused
1019 by reactive oxygen species (ROS) comprises one of the main theory to explain the aging
1020 [28,29] and more recently an excess of Fe has been involving in the progression of aging
1021 effects, by promotion of a type of oxidative cell death called ferroptosis [6].

1022 In the present study, it was investigated the detrimental effects of age on behavior of
1023 male and female of *Drosophila melanogaster* and the involvement of ferroptosis in this
1024 process by evaluating mortality, behavior alterations, lipid peroxidation, ROS production and
1025 GSH levels. Locomotor deficits in *D. melanogaster* was evaluated in different ages by
1026 analysis of negative geotaxis, footbridge test and balance test. Our results demonstrated
1027 detrimental effects of aging on locomotor behavior after 20 days of life that progressed over
1028 aging equally in both sexes. Our findings are in accordance with previous studies which
1029 reported a decline in locomotion of aging drosophilas [30,31]. Moreover, aging flies the time
1030 to cross the footbridge and the line by flies was longer that younger flies and many aging flies
1031 were unable to perform the balance test and were not included in the analysis. In this study,
1032 younger male flies display better performance in locomotor tests. Videlier et al., 2019 [32]
1033 demonstrated that locomotor activity in drosophila is influenced by body mass, reproductive
1034 status, and sex, among other factors and males are more active than females in daylight peaks.
1035 This behavior might reflect an increase in the energetic investment of males in the behavior of
1036 mate acquisition, thus increasing mating frequency and reproductive success [33]. In contrast
1037 both male and female flies performance in the tests was affected by age. Locomotor ability
1038 depends on a combined activity of the nervous system and musculature. Thus a decline in
1039 locomotor performance observed in aging flies might result from a defect in both systems
1040 associated with cumulative damage caused by ROS [30,34,35], thus possible decreasing the

1041 metabolic viability of cells as observed in this study.

1042 The role of iron in the progress of aging has been focus of attention and imbalance of
1043 iron metabolism is more prevalent in elderly population leading to detrimental consequences
1044 increasing the risk of mortality [10]. An excess of iron can deflagrate ferroptosis, which
1045 consists in non-apoptotic mechanism of cell death, characterized by a massive damage to cell
1046 has been implicated in neurological and cardiovascular diseases and cancers [17]. In this
1047 study, it was investigated for the first time the contribution of ferroptosis for detrimental
1048 effects of aging in fruit flies, in males and females. An augmented levels of Iron was observed
1049 in aging flies hemolymph. An accumulation of Iron has been demonstrated to be common in
1050 different species, as demonstrated in *C. elegans* and human brain. The mechanism possible
1051 implied in this phenomena is a compromised capacity of ferritin to store Iron and imbalance
1052 favoring iron influx. It is known that redox active metals, like Fe, are kept at low
1053 concentrations (0.2-0.5 μM) under physiological conditions, and the excess is bound to
1054 proteins, including ferritin, avoiding toxic responses [36]. In this study, GSH level was
1055 decreased in aging flies of both sexes, and a more prominent decrease was observed in
1056 females. GSH is an endogenous antioxidant acting on the neutralization of free radicals
1057 including $^{\circ}\text{OH}$ and is a reduced cofactor of glutathione peroxidase 4 (GPx4) [11], in the
1058 cytosol, GSH acts as a Fe (II) ligand [37]. A decrease in GSH could contribute to ROS
1059 accumulation and lead to Fe^{2+} release from ligand proteins contributing to the Fenton
1060 reaction, where Fe catalyzes the H_2O_2 breakdown yielding hydroxyl radicals and causing lipid
1061 peroxidation, a vital hallmark of ferroptosis [38]. In this regard, previous studies investigated
1062 comparative levels of GSH over aging in male and female of rats. It was observed that GSH
1063 content changed differently between tissues analyzed comparing males and females over
1064 aging [39] The decrease in GSH in aging has been related with a reduction in glutathione
1065 synthesis, as evidenced by a decrease in the levels of protein γ -glutamylcysteine synthetase

1066 (GCS) in aging rats brain. Thus our study does not provide enough results to explain the more
1067 prominent decrease in GSH in aging female flies however a hypothesis of a differential
1068 regulation in GSH synthesis of male and female over time and a tissue-specific decrease in
1069 GSH between sexes should not to be discarded. Additionally, our study demonstrated that
1070 females presented a higher life expectance than males. This increase could not be attributed
1071 uniquely to the GSH levels, once similar amount of GSH was found in male and females. It is
1072 important to mention that in other studies, similarly female tend to live significantly longer
1073 than males. These phenomena have been attributed to multifactorial factors including genetic,
1074 epigenetic and environmental factors [40].

1075 To understand the contribution of GSH decrease for detrimental effects of age, GSH
1076 levels was decreased with DEM. The results demonstrated a significant decrease in GSH by
1077 treatment with DEM in young and aging flies. Moreover an augmented mortality and decrease
1078 in locomotor performance was observed in aging and young flies. This findings highlights the
1079 protective role of GSH against oxidative damage induced by augmented levels of Fe in flies
1080 of both sexes and evidenced the contribution of ferroptosis for the detrimental effects of age.
1081 Similarly, it has been earlier demonstrated in increased Fe levels and free radicals production,
1082 in parallel with a decrease in GSH in aging *C. elegans* [6,27,35].

1083 Increasing evidence suggests that sex and gender play a significant role in the etiology,
1084 presentation, and treatment of various diseases. Important discoveries regarding the
1085 implication of sex and gender in diseases have been made through research on the organism
1086 *Drosophila melanogaster*. For instance, previous studies have reported differential responses
1087 between sexes in *Drosophila* concerning inflammatory response and biotransformation of
1088 toxic substances [41,42]. Our group's previous research has reported differential susceptibility
1089 of males and females to the 1-octen-3-ol (Volatile Organic Compound) [43]. In this study, the
1090 comparative analysis between sexes in *Drosophila* provides important insights into

1091 differential effects of aging on behavioral and biochemical parameters in male and females.
1092 These findings could underscore the importance of extending studies and considering sex in
1093 precision medicine approaches. A proposed hypothesis for Fe-induced damage in aging is
1094 represented in Fig. 8.

1095

1096

1097 **5. Conclusion**

1098

1099 The present study investigated the effects of aging on lifespan, oxidative damage,
1100 behavioral alterations, and iron (Fe) levels in male and female *Drosophila melanogaster*, and
1101 correlated these parameters with ferroptosis-related processes. Results showed that aging led
1102 to GSH depletion, Fe accumulation, increased reactive oxygen species (ROS) production, and
1103 lipid peroxidation. The study highlighted the protective role of GSH against aging-induced
1104 damage in flies. Overall, these findings provide valuable insights into the involvement of
1105 ferroptosis in the aging process of *D. melanogaster*, and suggest that this organism may serve
1106 as a reliable model for investigating aging-related mechanisms.

1107

1108 **6. Data Availability**

1109 The data used to support the findings of this study are available from the
1110 corresponding author upon request.

1111

1112 **7. Conflict of interest**

1113 The authors declare that there is no conflict of interest.

1114 **8. Acknowledgments**

1115 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
1116 Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. This study was supported by CNPq

1117 process #456207/2014-7; 405426/2021-6), Fapergs process #2380-2551/14-8, and
 1118 FAPERGS/PRONEX #16/25510000499-4. JLF, TP and MF are recipients of CNPq
 1119 fellowship; KKG and LPL are recipients of CAPES doctoral scholarship.

1120

1121 **Supplementary material I.** Footbridge test. Model made in Solidworks software and printed
 1122 on a 3D printer. Horizontal footbridge 13 cm long and 0.5 cm wide.

1123

1124 **Supplementary material II.** Balance test. Model made in Solidworks software and printed
 1125 on a 3D printer. Platform 3 cm long with two bases marking the beginning and end of the
 1126 walk. A nylon wire (thickness 0.10 mm) passes through this platform and is connected to the
 1127 starting bases.

1128

1129 **9. References**

- 1130 [1] B. Schöttker, K.-U. Saum, E.H.J.M. Jansen, P. Boffetta, A. Trichopoulou, B.
 1131 Holleczeck, A.K. Dieffenbach, H. Brenner, Oxidative Stress Markers and All-Cause
 1132 Mortality at Older Age: A Population-Based Cohort Study, *Journals Gerontol. Ser. A.*
 1133 70 (2015) 518–524. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu111>.
- 1134 [2] M.A. Halim, F.H.P. Tan, A. Azlan, I.I. Rasyid, N. Rosli, S. Shamsuddin, G. Azzam,
 1135 Ageing, *Drosophila melanogaster* and Epigenetics, *Malays. J. Med. Sci.* 27 (2020) 7–
 1136 19. <https://doi.org/10.21315/MJMS2020.27.3.2>.
- 1137 [3] G.N. Landis, D. Doherty, J. Tower, Analysis of *Drosophila melanogaster* Lifespan,
 1138 *Methods Mol. Biol.* 2144 (2020) 47–56. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0592-9_4.
- 1139 [4] T.B.L. Kirkwood, A. Kowald, The free-radical theory of ageing--older, wiser and still
 1140 alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support,
 1141 *Bioessays.* 34 (2012) 692–700. <https://doi.org/10.1002/BIES.201200014>.
- 1142 [5] D. Harman, The free radical theory of aging, *Antioxid. Redox Signal.* 5 (2003) 557–

- 1143 561. <https://doi.org/10.1089/152308603770310202>.
- 1144 [6] J.W. Larric, J.W. Larric, A.R. Mendelsoh, Contribution of Ferroptosis to Aging and
1145 Frailty, *Rejuvenation Res.* 23 (2020) 434–438. <https://doi.org/10.1089/REJ.2020.2390>.
- 1146 [7] T. Ems, K.S. Lucia, M.R. Huecker, Biochemistry, Iron Absorption, StatPearls. (2022).
1147 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448204/> (accessed November 29, 2022).
- 1148 [8] K. Mandilaras, T. Pathmanathan, F. Missirlis, Iron absorption in *Drosophila*
1149 *melanogaster*, *Nutrients.* 5 (2013) 1622–1647. <https://doi.org/10.3390/NU5051622>.
- 1150 [9] X. Chen, C. Yu, R. Kang, D. Tang, Iron Metabolism in Ferroptosis, *Front. Cell Dev.*
1151 *Biol.* 8 (2020) 590226. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.590226>.
- 1152 [10] M. Mazhar, A.U. Din, H. Ali, G. Yang, W. Ren, L. Wang, X. Fan, S. Yang,
1153 Implication of ferroptosis in aging, *Cell Death Discov.* 7 (2021) 1–9.
1154 <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00553-6>.
- 1155 [11] C. Berndt, C.H. Lillig, Glutathione, Glutaredoxins, and Iron, *Antioxid. Redox Signal.*
1156 27 (2017) 1235–1251. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7132>.
- 1157 [12] G.O. Latunde-Dada, Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy,
1158 *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861 (2017) 1893–1900.
1159 <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.05.019>.
- 1160 [13] J.Y. Cao, S.J. Dixon, Mechanisms of ferroptosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 2195–
1161 2209. <https://doi.org/10.1007/S00018-016-2194-1>.
- 1162 [14] H. Feng, B.R. Stockwell, Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause
1163 ferroptosis?, *PLoS Biol.* 16 (2018). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2006203>.
- 1164 [15] S. Neitemeier, A. Jelinek, V. Laino, L. Hoffmann, I. Eisenbach, R. Eying, G.K.
1165 Ganjam, A.M. Dolga, S. Oppermann, C. Culmsee, BID links ferroptosis to
1166 mitochondrial cell death pathways, *Redox Biol.* 12 (2017) 558–570.
1167 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.007>.

- 1168 [16] R.L. Bertrand, Iron accumulation, glutathione depletion, and lipid peroxidation must
1169 occur simultaneously during ferroptosis and are mutually amplifying events, *Med.*
1170 *Hypotheses*. 101 (2017) 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.02.017>.
- 1171 [17] W.S. Yang, B.R. Stockwell, Ferroptosis: death by lipid peroxidation, *Trends Cell Biol.*
1172 26 (2016) 165. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.10.014>.
- 1173 [18] C. Berndt, C.H. Lillig, Glutathione, Glutaredoxins, and Iron, *Antioxid. Redox Signal.*
1174 27 (2017) 1235–1251. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7132>.
- 1175 [19] K.K. Gomes, G.E. MacEdo, N.R. Rodrigues, C.C. Ziech, I.K. Martins, J.F. Rodrigues,
1176 P. De Brum Vieira, A.A. Boligon, F.E. De Brito Junior, I.R.A. De Menezes, J.L.
1177 Franco, T. Posser, Croton campestris A. St.-Hill Methanolic Fraction in a Chlorpyrifos-
1178 Induced Toxicity Model in *Drosophila melanogaster*: Protective Role of Gallic Acid,
1179 *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020 (2020). <https://doi.org/10.1155/2020/3960170>.
- 1180 [20] N.D. Bland, P. Robinson, J.E. Thomas, A.D. Shirras, A.J. Turner, R.E. Isaac,
1181 Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing
1182 neprilysin 2, *Peptides*. 30 (2009) 571–574.
1183 <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2008.10.020>.
- 1184 [21] A. Wosnitza, T. Bockemüh, M. Dübbert, H. Scholz, A. Büschges, Inter-leg
1185 coordination in the control of walking speed in *Drosophila*, *J. Exp. Biol.* 216 (2013)
1186 480–491. <https://doi.org/10.1242/jeb.078139>.
- 1187 [22] K.G. Iliadi, O.B. Gluscencova, G.L. Boulianne, Psychomotor behavior: A practical
1188 approach in *Drosophila*, *Front. Psychiatry*. 7 (2016) 153.
1189 <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2016.00153/BIBTEX>.
- 1190 [23] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
1191 [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- 1192 [24] A. Sachett, M. Gallas-Lopes, G.M. M Conterato, R. Benvenuti, A.P. Herrmann, A.

- 1193 Piato, Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for
1194 zebrafish brain tissue, (2020). <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw>.
- 1195 [25] J.K. Herren, J.C. Paredes, F. Schüpfer, K. Arafah, P. Bulet, B. Lemaitre, Insect
1196 endosymbiont proliferation is limited by lipid availability, *Elife*. 3 (2014) e02964.
1197 <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02964>.
- 1198 [26] F. Masson, S. Rommelaere, A. Marra, F. Schüpfer, B. Lemaitre, Dual proteomics of
1199 *Drosophila melanogaster* hemolymph infected with the heritable endosymbiont
1200 *Spiroplasma poulsonii*, *PLoS One*. 16 (2021) e0250524.
1201 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0250524>.
- 1202 [27] N.L. Jenkins, S.A. James, A. Salim, F. Sumardy, T.P. Speed, M. Conrad, D.R.
1203 Richardson, A.I. Bush, G. McColl, Changes in ferrous iron and glutathione promote
1204 ferroptosis and frailty in aging *Caenorhabditis elegans*, *Elife*. 9 (2020) 1–28.
1205 <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56580>.
- 1206 [28] J.P. da Costa, R. Vitorino, G.M. Silva, C. Vogel, A.C. Duarte, T. Rocha-Santos, A
1207 synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects, *Ageing Res. Rev.* 29
1208 (2016) 90–112. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2016.06.005>.
- 1209 [29] K.G. Iliadi, G.L. Boulianne, Age-related behavioral changes in *Drosophila*, *Ann. N. Y.*
1210 *Acad. Sci.* 1197 (2010) 9–18. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2009.05372.X>.
- 1211 [30] M.A. Jones, M. Grotewiel, *Drosophila* as a Model for Age-Related Impairment in
1212 Locomotor and other Behaviors, *Exp. Gerontol.* 46 (2011) 320.
1213 <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2010.08.012>.
- 1214 [31] D. Rhodenizer, I. Martin, P. Bhandari, S.D. Pletcher, M. Grotewiel, Genetic and
1215 environmental factors impact age-related impairment of negative geotaxis in
1216 *Drosophila* by altering age-dependent climbing speed, *Exp. Gerontol.* 43 (2008) 739–
1217 748. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2008.04.011>.

- 1218 [32] M. Videlier, H.D. Rundle, V. Careau, Sex-Specific Among-Individual Covariation in
1219 Locomotor Activity and Resting Metabolic Rate in *Drosophila melanogaster*, *Am. Nat.*
1220 194 (2019) E164–E176. <https://doi.org/10.1086/705678>.
- 1221 [33] A.J. Bateman, Intra-sexual selection in *Drosophila*, *Hered.* 1948 23. 2 (1948) 349–368.
1222 <https://doi.org/10.1038/hdy.1948.21>.
- 1223 [34] J.K. Woods, S. Kowalski, B. Rogina, Determination of the spontaneous locomotor
1224 activity in *Drosophila melanogaster*, *J. Vis. Exp.* (2014). <https://doi.org/10.3791/51449>.
- 1225 [35] S. Bar, M. Prasad, R. Datta, Neuromuscular degeneration and locomotor deficit in a
1226 *Drosophila* model of mucopolysaccharidosis VII is attenuated by treatment with
1227 resveratrol, *Dis. Model. Mech.* 11 (2018). <https://doi.org/10.1242/DMM.036954>.
- 1228 [36] S.A. James, B.R. Roberts, D.J. Hare, M.D. De Jonge, I.E. Birchall, N.L. Jenkins, R.A.
1229 Cherny, A.I. Bush, G. McColl, Direct in vivo imaging of ferrous iron dyshomeostasis
1230 in ageing *Caenorhabditis elegans*, *Chem. Sci.* 6 (2015) 2952–2962.
1231 <https://doi.org/10.1039/C5SC00233H>.
- 1232 [37] T. Homma, S. Kobayashi, J. Fujii, Cysteine preservation confers resistance to
1233 glutathione-depleted cells against ferroptosis via CDGSH iron sulphur domain-
1234 containing proteins (CISDs), *Free Radic. Res.* 54 (2020) 397–407.
1235 <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1780229>.
- 1236 [38] G.O. Latunde-Dada, Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy,
1237 *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 1861 (2017) 1893–1900.
1238 <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.05.019>.
- 1239 [39] H. Wang, H. Liu, R.M. Liu, Gender difference in glutathione metabolism during aging
1240 in mice, *Exp. Gerontol.* 38 (2003) 507–517. [https://doi.org/10.1016/S0531-](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00036-6)
1241 [5565\(03\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00036-6).
- 1242 [40] Z. Pan, C. Chang, Gender and the regulation of longevity: implications for

- 1243 autoimmunity, *Autoimmun. Rev.* 11 (2012).
- 1244 <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2011.12.004>.
- 1245 [41] R.B. Jain, Distributions of selected urinary metabolites of volatile organic compounds
1246 by age, gender, race/ethnicity, and smoking status in a representative sample of U.S.
1247 adults, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 (2015) 471–479.
1248 <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2015.07.018>.
- 1249 [42] G.J. Casimir, N. Lefèvre, F. Corazza, J. Duchateau, M. Chamekh, The Acid-Base
1250 Balance and Gender in Inflammation: A Mini-Review, *Front. Immunol.* 9 (2018).
1251 <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00475>.
- 1252 [43] G.E. Macedo, P. de Brum Vieira, N.R. Rodrigues, K.K. Gomes, I.K. Martins, J.L.
1253 Franco, T. Posser, Fungal compound 1-octen-3-ol induces mitochondrial
1254 morphological alterations and respiration dysfunctions in *Drosophila melanogaster*,
1255 *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 206 (2020).
1256 <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111232>.
- 1257
- 1258
- 1259
- 1260
- 1261
- 1262
- 1263
- 1264
- 1265

1266

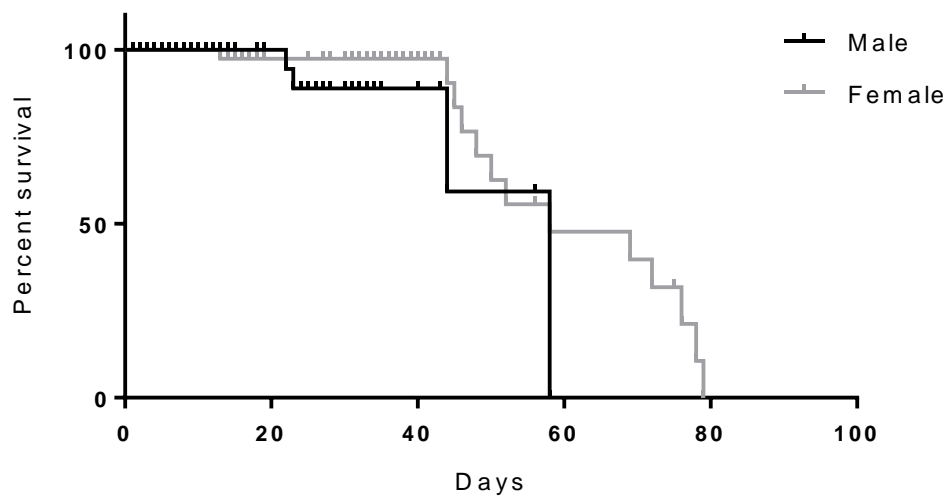
1267

Figures and Legends

1268

1269 **Figure 1.** Female flies have a longer life expectancy than males. The black line refers to male
1270 survival and the gray line refers to female survival.

Gomes et al., 2022



1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

1278

1279

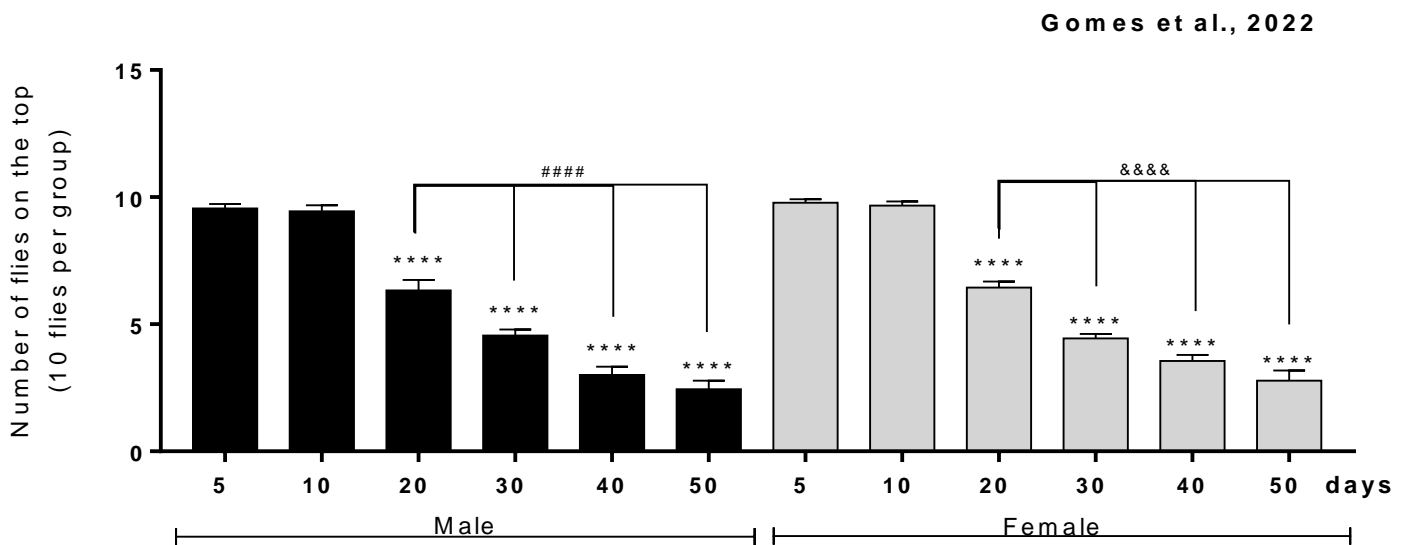
1280

1281

1282

1283

1284 **Figure 2.** Negative geotaxis performed on the 5, 10, 20, 30, 40, 50 days old flies, starts to
 1285 show a decrease on the twentieth day of life for both sexes. The results are represented as
 1286 mean \pm standard error (SEM) and are expressed in number of flies on top. ****p < 0.0001
 1287 about their respective control (5-days-old male or 5-days-old female), ####p<0.0001 female
 1288 in different old, and &&&&p<0.0001 male in different old.



1289

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297

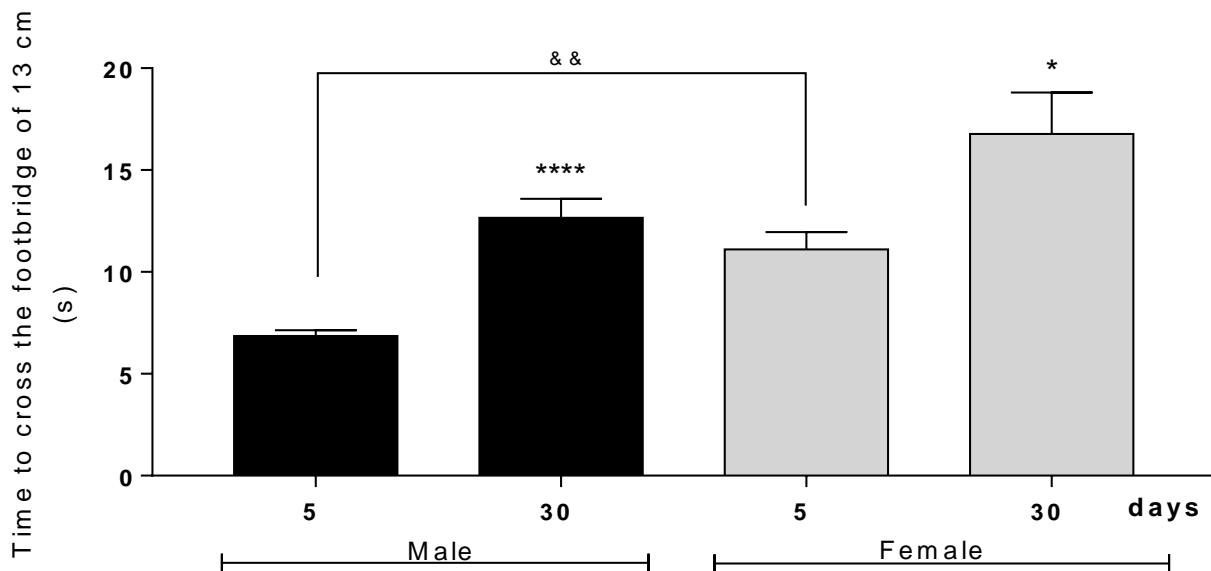
1298

1299

1300

1301 **Figure 3.** Males and females of *Drosophila melanogaster* with 30-days-old show a decrease
 1302 in walking ability performed by the footbridge test. In addition, 5-days-old males are faster
 1303 than females of the same age. The results are represented as mean \pm standard error (SEM) and
 1304 are expressed in time to cross. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ in relation to their respective control
 1305 (5-days-old male or 5 days-old-female) and && $p < 0.01$, in relation 5-days-old males with 5-
 1306 days-old females.

Gomes et al., 2022



1307
 1308

1309

1310

1311

1312

1313

1314

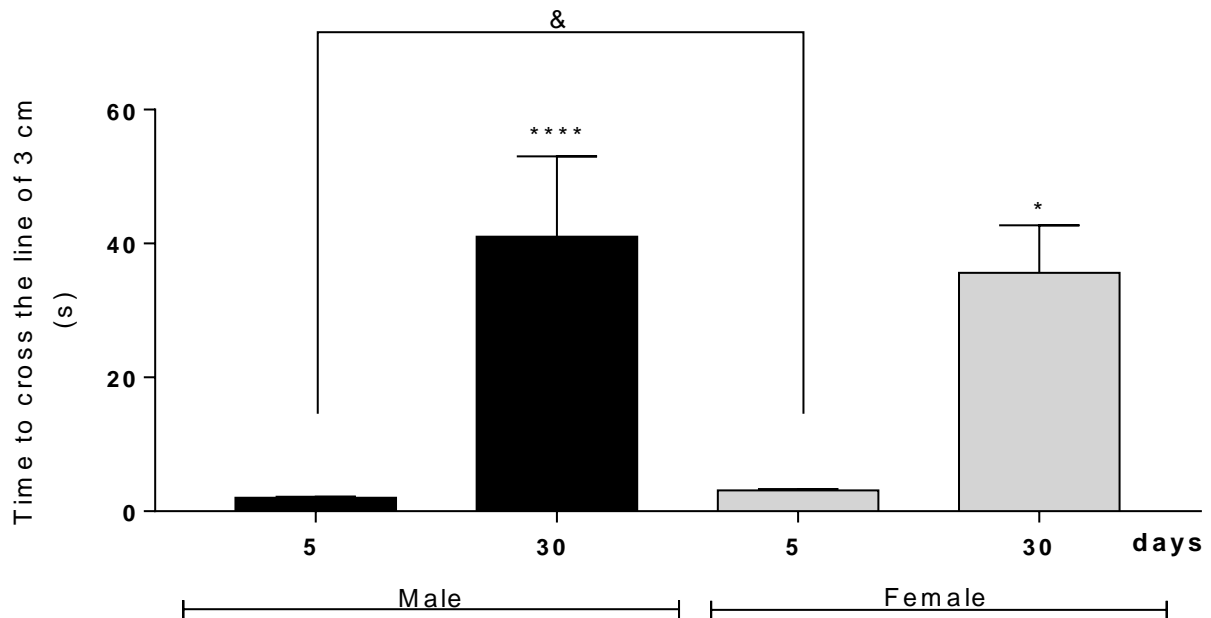
1315

1316

1317

1318 **Figure 4.** Males and females of *Drosophila melanogaster* with 30-days-old show a drop in
 1319 the balance test. Males at 5-days-old cross the 3 cm line more easily than females of the same
 1320 age. Represents the number of flies that crossed the 3 cm line within 60 sec. The results are
 1321 represented as mean \pm standard error (SEM) and are expressed in time to cross. * $p < 0.05$,
 1322 **** $p < 0.0001$ in relation to their respective control (5-days-old male or 5-days-old female)
 1323 and & $p < 0.05$ in relation 5-days-old male with 5-days-old female.

Gomes et al., 2022



1324
1325

1326

1327

1328

1329

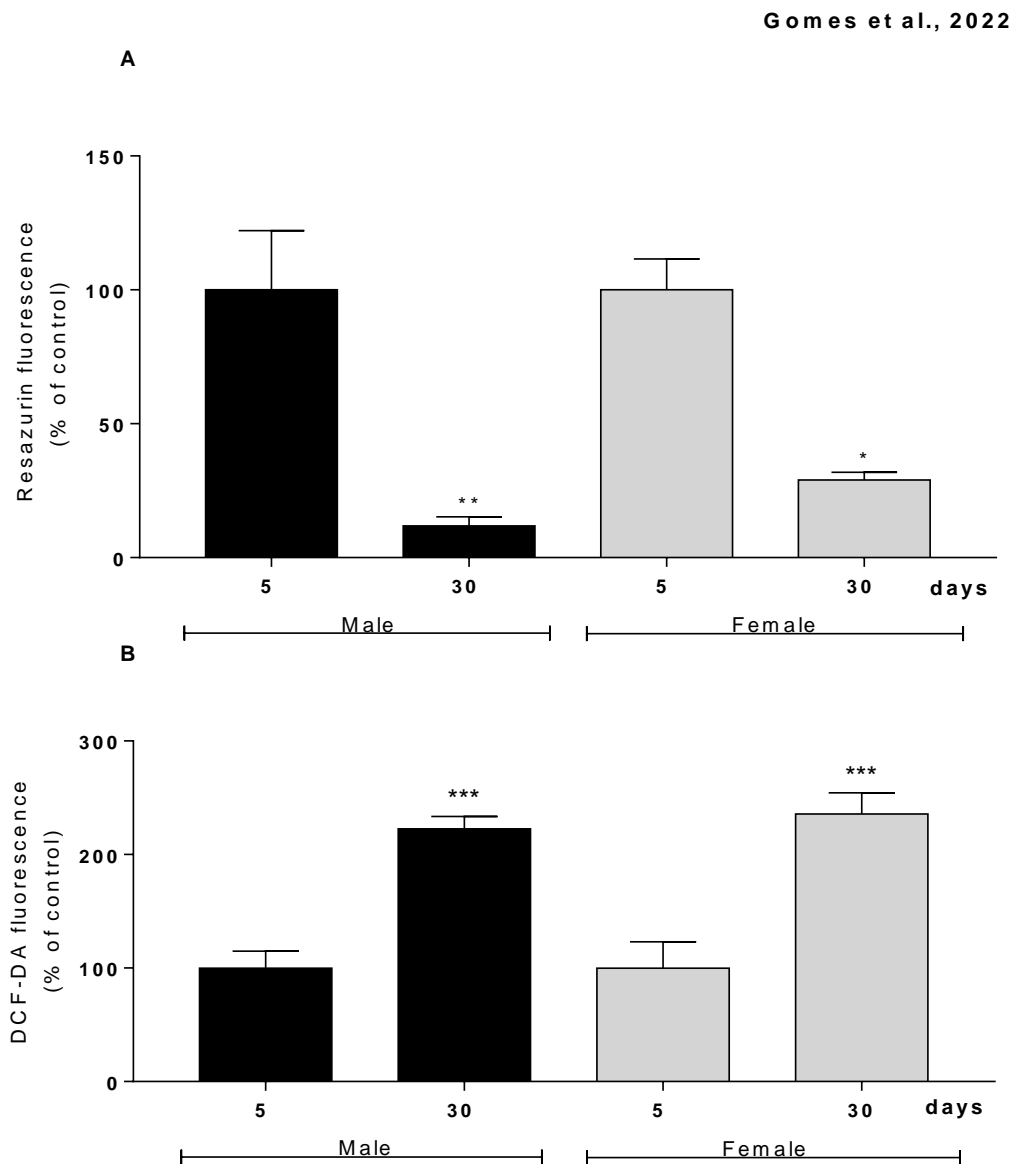
1330

1331

1332

1333

1334 **Figure 5.** Males and females of *Drosophila melanogaster* at 30-days-old show a decrease in
 1335 cell viability and increased levels of ROS. (A) Cell viability and (B) ROS levels. The results
 1336 are represented as mean \pm standard error (SEM) and are expressed as a percentage. * $p < 0.05$,
 1337 ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ in relation to their respective control (5-days-old male or 5-days-
 1338 old female).

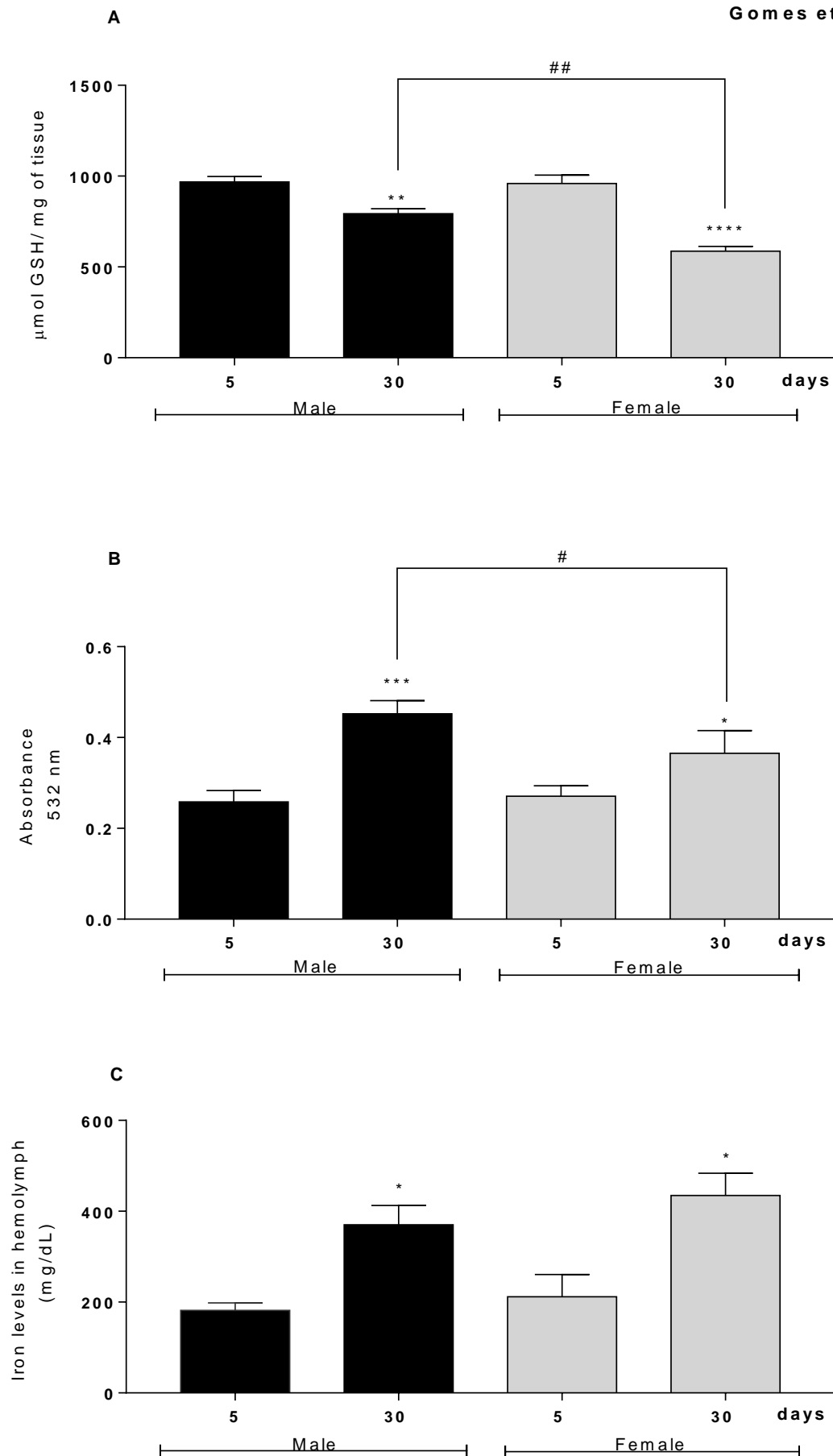


1339

1340

1341

1342 **Figure 6.** Males and females of *Drosophila melanogaster* at 30-days-old show a decrease in
1343 GSH levels, an increase in lipid peroxidation and an increase in Fe levels. In addition, males
1344 and females with 30 days of life differed from each other in GSH assay and lipid peroxidation
1345 assay. (A) GSH levels, (B) Lipid peroxidation and (C) Fe levels. The results are represented
1346 as mean \pm standard error (SEM) and expressed: (A) mmol GSH/ mg of tissue, (B) Tbars
1347 absorbance and (C) mg/dL of hemolymph * p<0.05, ** p <0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001
1348 about their respective control (5-days-old male or 5-days-old female) and # p<0.05, ## p<
1349 0.01 in relation the 30-days-old male with 30-days-old female.



1351 **Figure 7.** GSH depletor (DEM) worsens GSH levels and negative geotaxis in 30-days-old
1352 males and females of *Drosophila melanogaster*. (A) Mortality caused by DEM after 24 h of
1353 exposure, (B) Negative geotaxis, (C) GSH levels. Results are represented as mean \pm standard
1354 error (SEM) and are expressed (A) In number of dead flies (B) Number of flies on top and (C)
1355 Per mmol GSH/ mg of tissue. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ about their
1356 respective control (5-days-old male or 5-days-old female), ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$,
1357 #### $p < 0.0001$ in relation to the same group, but without DEM and && $p < 0.01$ &&&& $p < 0.0001$
1358 about 5-days-old male with 5-days-old female with and without DEM.

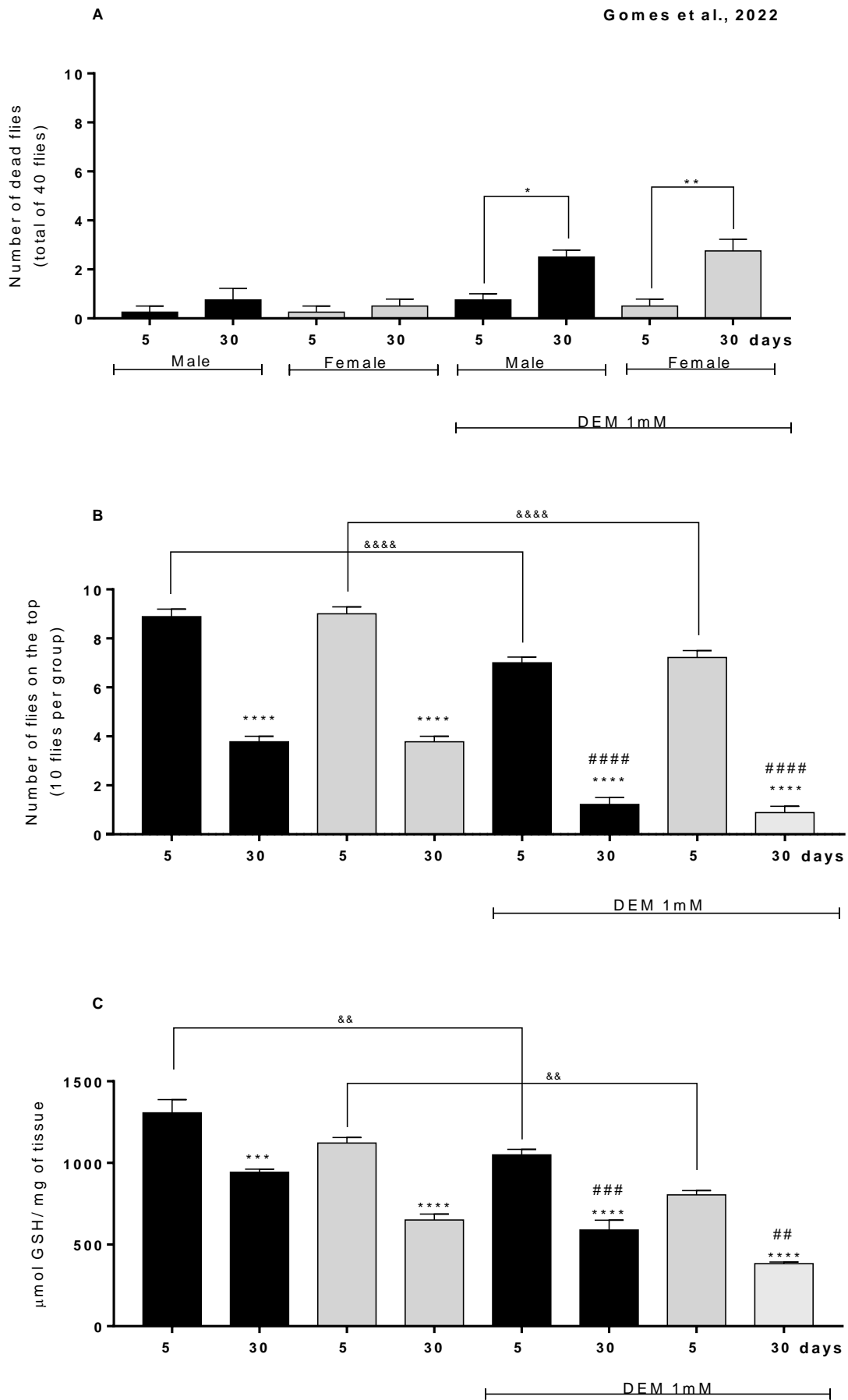
1359

1360

1361

1362

1363

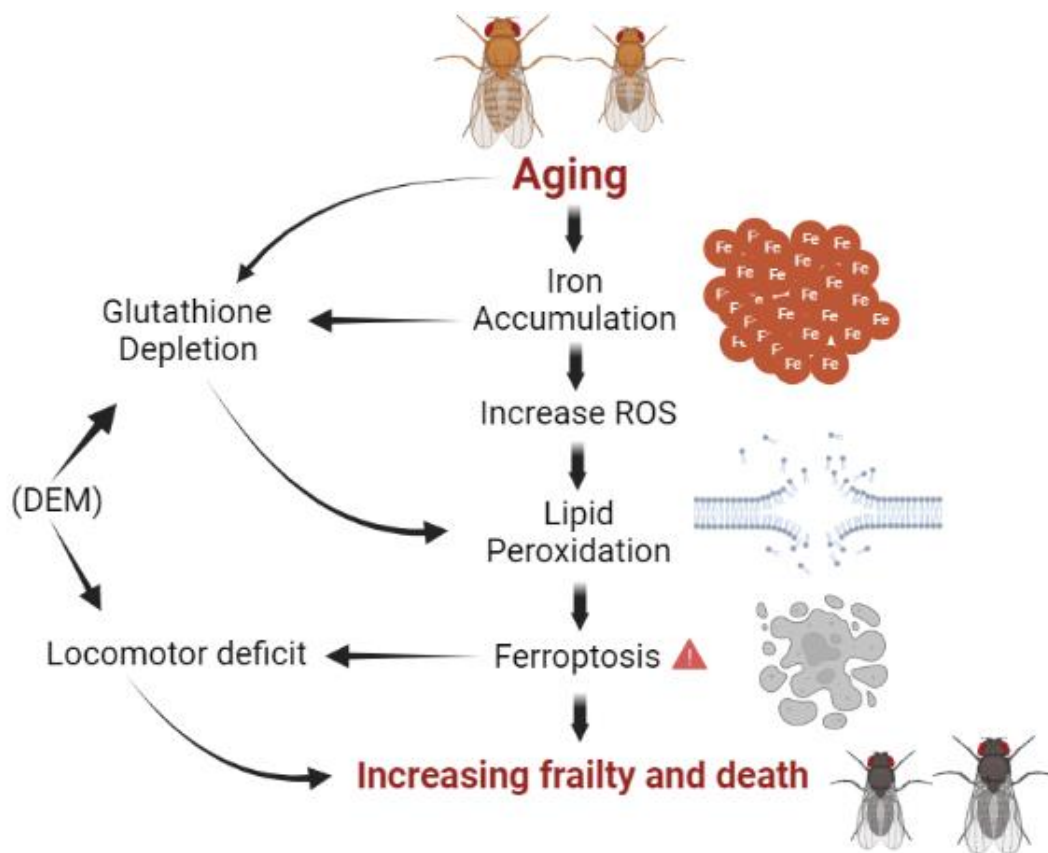


1365 **Figure 8.** Proposed hypothesis for Fe-induced damage in aging. Natural aging leads to Fe
 1366 accumulation and glutathione depletion, this iron accumulation increases ROS, leading to
 1367 lipid peroxidation, glutathione depletion also leads to this damage, occurring ferroptosis that
 1368 causes changes in behaviors and ultimately fragility and death. DEM worsens locomotor
 1369 damage and accelerates death.

1370

Gomes et al., 2022

1371



1372

1373

1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

1381 **5. Conclusão**

1382

1383 Este estudo investigou os impactos do envelhecimento na expectativa de vida, nos danos
 1384 oxidativos, nas modificações comportamentais e nos níveis de Fe em *Drosophila*
 1385 *melanogaster*, tanto em machos quanto em fêmeas, estabelecendo correlações com processos
 1386 vinculados à ferroptose. Os resultados indicaram que o processo de envelhecimento resultou
 1387 na redução de GSH, acúmulo de Fe, aumento na produção de EROs e peroxidação lipídica. O
 1388 estudo ressaltou a função protetora da GSH contra os danos provocados pelo envelhecimento
 1389 nas moscas. De maneira abrangente, essas descobertas proporcionam discernimentos valiosos
 1390 sobre a participação da ferroptose no processo de envelhecimento de machos e fêmeas da
 1391 espécie *Drosophila melanogaster*.

1392

1393

1394

1395 **6. Outros trabalhos e atividades desenvolvidas durante o doutorado**

1396

1397 **Artigos científicos publicados:**

1398

1399 Luana Paganotto Leandro, Maria Vitória Takemura Mariano, Karen Kich Gomes, Ana
 1400 Beatriz Dos Santos, Jaciana Sousa dos Anjos, Nelson Rodrigues de Carvalho, Mauro
 1401 Eugênio Medina Nunes, Marcelo Farina, Thais Posser, Jeferson Luís Franco

1402 **Permissible concentration of mancozeb in Brazilian drinking water elicits oxidative**
 1403 **stress and bioenergetic impairments in embryonic zebrafish**

1404 Páginas:122023. Publicado: 25 de junho de 2023. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122013

1405 Revista: Environmental Pollution

1406 Maria Vitória Takemura Mariano, Luana Paganotto Leandro, Karen Kich Gomes, Ana Beatriz
 1407 Dos Santos, Vitor Oliveira de Rosso, Alcimir Luiz Dafre, Marcelo Farina, Thais Posser,
 1408 Jeferson Luís Franco

1409 **Assessing the disparity: comparative toxicity of Copper in zebrafish larvae exposes**
 1410 **alarming consequences of permissible concentrations in Brazil**

1411 Páginas: 166-184. Publicado:26 de dezembro de 2023 DOI: 10.1080/15287394.2023.2290630

1412 Revista: Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A

1413

1414

- 1415 Nathane Rosa Rodrigues, Giulianna Echeverria Macedo, Illana Kemmerich Martins, Patrícia
1416 de Brum Vieira, Karen Kich Gomes, Thaís Posser, Jeferson Luís Franco
- 1417 **Sleep disturbance induces a modulation of clock gene expression and alters metabolism**
1418 **regulation in drosophila**
- 1419 Páginas: 114334. Publicado: 17 de agosto de 2023. DOI: 10.1016/j.physbeh.2023.114334
1420 Revista: Physiology & Behavior
1421
1422
- 1423 **Artigo científico submetido:**
- 1424 Ana Beatriz dos Santos, Jaciana Souza dos Anjos, Giany Gabriely Padão dos Santos, Maria
1425 Vitória Takemura Mariano, Luana Paganotto Leandro, Marcelo Farina, Jeferson Luis Franco,
1426 Karen Kich Gomes*, Thais Posser*
- 1427 **Developmental Iron exposure induces locomotor alterations in *Drosophila*: exploring**
1428 **potential association with Oxidative Stress**
- 1429 Submetido em janeiro de 2024
1430 Revista: Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology
1431
- 1432 **Coorientação de TCC:**
- 1433 **Exposição ao ferro causa alterações no metabolismo de *Drosophila melanogaster***
1434 Aluna: Jaciana dos Anjos
1435
- 1436 **Exposição pré-imaginal ao Ferro causa alterações comportamentais similares ao**
1437 **autismo e modula a atividade de enzimas antioxidantes em *Drosophila melanogaster***
1438 Aluna: Ana Beatriz dos Santos
1439
- 1440 **Participação em congresso científico:**
- 1441 **Toxilatin 2023- Congresso Latino Americano de Toxicologia Ambiental, experimental e**
1442 **nanomateriais- Belo Horizonte (MG)**
1443
- 1444 **Congresso Brasileiro de Agroecologia- Rio de Janeiro (RJ)**
1445
1446
1447
1448

1449 **Referências Bibliográficas**

1450

- 1451 Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim,
1452 V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores
1453 modulatórios. *Rev. Nutr.* <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- 1454 Barra, K., Barbosa, F., Maria, N., Costa, B., De Cássia, R., Alfenas, G., Oliveira, S., Paula,
1455 D.E., Paula, V., Minim, R., Bressan, J., 2010. Revista de Nutrição Oxidative stress:
1456 concept, implications and modulating factors, *Revista Nutrição*.
- 1457 Bekenstein, U., Kadener, S., 2011. What can *Drosophila* teach us about iron-accumulation
1458 neurodegenerative disorders? *J. Neural Transm.* 118, 389–396.
1459 <https://doi.org/10.1007/S00702-010-0511-7/FIGURES/3>
- 1460 Berndt, C., Lillig, C.H., 2017a. Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. *Antioxid. Redox Signal.*
1461 27, 1235–1251. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7132>
- 1462 Berndt, C., Lillig, C.H., 2017b. Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. *Antioxid. Redox Signal.*
1463 27, 1235–1251. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7132>
- 1464 Brenman-Suttner, D.B., Yost, R.T., Frame, A.K., Robinson, J.W., Moehring, A.J., Simon,
1465 A.F., 2020. Social behavior and aging: A fly model. *Genes. Brain. Behav.* 19.
1466 <https://doi.org/10.1111/GBB.12598>
- 1467 Chechenova, M., Stratton, H., Kiani, K., Gerberich, E., Alekseyenko, A., Tamba, N., An, S.,
1468 Castillo, L., Czajkowski, E., Talley, C., Bryantsev, A., 2023. Quantitative model of
1469 aging-related muscle degeneration: a *Drosophila* study. *bioRxiv* 2023.02.19.529145.
1470 <https://doi.org/10.1101/2023.02.19.529145>
- 1471 Debès, C., Papadakis, A., Grönke, S., Karalay, Ö., Tain, L.S., Mizi, A., Nakamura, S., Hahn,
1472 O., Weigelt, C., Josipovic, N., Zirkel, A., Brusius, I., Sofiadis, K., Lamprousi, M., Lu,
1473 Y.X., Huang, W., Esmailie, R., Kubacki, T., Späth, M.R., Schermer, B., Benzing, T.,
1474 Müller, R.U., Antebi, A., Partridge, L., Papanonis, A., Beyer, A., 2023. Ageing-
1475 associated changes in transcriptional elongation influence longevity. *Nat.* 2023 6167958
1476 616, 814–821. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05922-y>
- 1477 Demontis, F., Perrimon, N., 2010. FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates
1478 organism-wide proteostasis during aging. *Cell* 143, 813–825.
1479 <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.10.007>
- 1480 Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E.,
1481 Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R.,
1482 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060–

- 1483 1072. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.042>
- 1484 Dixon, S.J., Pratt, D.A., 2023. Ferroptosis: A flexible constellation of related biochemical
1485 mechanisms. *Mol. Cell* 83, 1030–1042. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2023.03.005>
- 1486 Du, Y., Guo, Z., 2022. Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors. *Cell Death*
1487 *Discov.* 2022 81 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01297-7>
- 1488 Flint, B., Tadi, P., 2023a. Physiology, Aging. *StatPearls*.
- 1489 Flint, B., Tadi, P., 2023b. Physiology, Aging. *StatPearls*.
- 1490 Forman, H.J., Zhang, H., 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations
1491 of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021 209 20, 689–709.
1492 <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- 1493 Galaris, D., Barbouti, A., Pantopoulos, K., 2019. Iron homeostasis and oxidative stress: An
1494 intimate relationship. *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Res.* 1866.
1495 <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2019.118535>
- 1496 Gartzke, L.P., Hendriks, K.D.W., Hoogstra-Berends, F., Joschko, C.P., Strandmoe, A.L.,
1497 Vogelaar, P.C., Krenning, G., Henning, R.H., 2023. Inhibition of Ferroptosis Enables
1498 Safe Rewarming of HEK293 Cells following Cooling in University of Wisconsin Cold
1499 Storage Solution. *Int. J. Mol. Sci.* 24. <https://doi.org/10.3390/IJMS241310939>
- 1500 Goldhaber, G., Segal, G., Dagan, A., 2020. Hyperferritinemia in the elderly can differentiate
1501 the bad from the worst: A retrospective cohort analysis. *Medicine (Baltimore)*. 99,
1502 E21419. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021419>
- 1503 Gonzalez, A., 2020. Antioxidants and Neuron-Astrocyte Interplay in Brain Physiology:
1504 Melatonin, a Neighbor to Rely on. *Neurochem. Res.* [https://doi.org/10.1007/s11064-020-](https://doi.org/10.1007/s11064-020-02972-w)
1505 [02972-w](https://doi.org/10.1007/s11064-020-02972-w)
- 1506 Harman, D., 2003. The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 557–561.
1507 <https://doi.org/10.1089/152308603770310202>
- 1508 He, Y., Jasper, H., 2014. Studying Aging in *Drosophila*. *Methods* 68, 129.
1509 <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.04.008>
- 1510 Hiew, S., Eibeck, L., Nguemini, C., Zeller, D., 2023. The Influence of Age and Physical
1511 Activity on Locomotor Adaptation. *Brain Sci.* 13.
1512 <https://doi.org/10.3390/BRAINSKI13091266>
- 1513 Homma, T., Kobayashi, S., Fujii, J., 2020. Cysteine preservation confers resistance to
1514 glutathione-depleted cells against ferroptosis via CDGSH iron sulphur domain-
1515 containing proteins (CISDs). *Free Radic. Res.* 54, 397–407.
1516 <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1780229>

- 1517 Hu, Y., Wu, H., Lu, C., Xu, H., Li, B., Guan, W., Wu, M., Gao, Y., Tong, H., 2023. Cadmium
1518 chloride exposure impairs the growth and behavior of *Drosophila* via ferroptosis. *Sci.*
1519 *Total Environ.* 865, 161183. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.161183>
- 1520 Jacomin, A.C., Geraki, K., Brooks, J., Tjendana-Tjhin, V., Collingwood, J.F., Nezis, I.P.,
1521 2019. Impact of Autophagy and Aging on Iron Load and Ferritin in *Drosophila* Brain.
1522 *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 142. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00142>
- 1523 Jenkins, N.L., James, S.A., Salim, A., Sumardy, F., Speed, T.P., Conrad, M., Richardson,
1524 D.R., Bush, A.I., McColl, G., 2020a. Changes in ferrous iron and glutathione promote
1525 ferroptosis and frailty in aging *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 9, 1–28.
1526 <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56580>
- 1527 Jenkins, N.L., James, S.A., Salim, A., Sumardy, F., Speed, T.P., Conrad, M., Richardson,
1528 D.R., Bush, A.I., McColl, G., 2020b. Changes in ferrous iron and glutathione promote
1529 ferroptosis and frailty in aging *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 9, 1–28.
1530 <https://doi.org/10.7554/ELIFE.56580>
- 1531 Jones, M.A., Grotewiel, M., 2011. *Drosophila* as a Model for Age-Related Impairment in
1532 Locomotor and other Behaviors. *Exp. Gerontol.* 46, 320.
1533 <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2010.08.012>
- 1534 Killilea, D.W., Atamna, H., Liao, C., Ames, B.N., 2003. Iron accumulation during cellular
1535 senescence in human fibroblasts in vitro. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 507–516.
1536 <https://doi.org/10.1089/152308603770310158>
- 1537 Landis, G.N., Doherty, D., Tower, J., 2020. Analysis of *Drosophila melanogaster* Lifespan.
1538 *Methods Mol. Biol.* 2144, 47–56. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0592-9_4
- 1539 Larric, James W., Larric, Jasmine W., Mendelsoh, A.R., 2020. Contribution of Ferroptosis to
1540 Aging and Frailty. *Rejuvenation Res.* 23, 434–438.
1541 <https://doi.org/10.1089/REJ.2020.2390>
- 1542 Latunde-Dada, G.O., 2017. Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy.
1543 *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861, 1893–1900.
1544 <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2017.05.019>
- 1545 Li, F.J., Long, H.Z., Zhou, Z.W., Luo, H.Y., Xu, S.G., Gao, L.C., 2022. System Xc -
1546 /GSH/GPX4 axis: An important antioxidant system for the ferroptosis in drug-resistant
1547 solid tumor therapy. *Front. Pharmacol.* 13. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.910292>
- 1548 Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., Guan, F., 2021a. Aging and
1549 age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* 22,
1550 165–187. <https://doi.org/10.1007/S10522-021-09910-5>

- 1551 Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., Guan, F., 2021b. Aging and
1552 age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* 22,
1553 165–187. <https://doi.org/10.1007/S10522-021-09910-5>
- 1554 Liu, B., Sun, Y., Xu, G., Snetselaar, L.G., Ludewig, G., Wallace, R.B., Bao, W., 2019.
1555 Association between Body Iron Status and Leukocyte Telomere Length, a Biomarker of
1556 Biological Aging, in a Nationally Representative Sample of US Adults. *J. Acad. Nutr.*
1557 *Diet.* 119, 617–625. <https://doi.org/10.1016/J.JAND.2018.09.007>
- 1558 Liu, J., Li, J., Kang, R., Tang, D., 2023. Cell type-specific induction of ferroptosis to boost
1559 antitumor immunity. *Oncoimmunology* 12, 2282252.
1560 <https://doi.org/10.1080/2162402X.2023.2282252>
- 1561 López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2023. Hallmarks of
1562 aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243–278.
1563 <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.11.001>
- 1564 Massie, H.R., Aiello, V.R., Williams, T.R., 1993. Inhibition of iron absorption prolongs the
1565 life span of *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* 67, 227–237. [https://doi.org/10.1016/0047-](https://doi.org/10.1016/0047-6374(93)90001-8)
1566 [6374\(93\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0047-6374(93)90001-8)
- 1567 Massie, H.R., Aiello, V.R., Williams, T.R., 1985. Iron accumulation during development and
1568 ageing of *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* 29, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0047-](https://doi.org/10.1016/0047-6374(85)90020-X)
1569 [6374\(85\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0047-6374(85)90020-X)
- 1570 Mazhar, M., Din, A.U., Ali, H., Yang, G., Ren, W., Wang, L., Fan, X., Yang, S., 2021.
1571 Implication of ferroptosis in aging. *Cell Death Discov.* 7, 1–9.
1572 <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00553-6>
- 1573 Mehrabani, S., Arab, A., Mohammadi, H., Amani, R., 2020. The effect of cocoa consumption
1574 on markers of oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of interventional
1575 studies. *Complement. Ther. Med.* 48. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102240>
- 1576 Miess, H., Dankworth, B., Gouw, A.M., Rosenfeldt, M., Schmitz, W., Jiang, M., Saunders,
1577 B., Howell, M., Downward, J., Felsher, D.W., Peck, B., Schulze, A., 2018. The
1578 glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid
1579 metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 37, 5435.
1580 <https://doi.org/10.1038/S41388-018-0315-Z>
- 1581 Mollá-Albaladejo, R., Sánchez-Alcañiz, J.A., 2021. Behavior Individuality: A Focus on
1582 *Drosophila melanogaster*. *Front. Physiol.* 12.
1583 <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.719038>
- 1584 Moraes, K.C.M., Montagne, J., 2021. *Drosophila melanogaster*: A Powerful Tiny Animal

- 1585 Model for the Study of Metabolic Hepatic Diseases. *Front. Physiol.* 12, 728407.
 1586 <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.728407>
- 1587 Murray, M.B., Leak, L.B., Lee, W.C., Dixon, S.J., 2023. Protocol for detection of ferroptosis
 1588 in cultured cells. *STAR Protoc.* 4. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2023.102457>
- 1589 Nakai, K., Tsuruta, D., 2021. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and
 1590 Oxidative Stress in Skin Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* 22.
 1591 <https://doi.org/10.3390/IJMS221910799>
- 1592 Nishimura, M., Ocorr, K., Bodmer, R., Cartry, J., 2011. *Drosophila* as a model to study
 1593 cardiac aging. *Exp. Gerontol.* 46, 326–330.
 1594 <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2010.11.035>
- 1595 Ocorr, K., Akasaka, T., Bodmer, R., 2007. Age-related cardiac disease model of *Drosophila*.
 1596 *Mech. Ageing Dev.* 128, 112–116. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2006.11.023>
- 1597 Palmer, A.K., Jensen, M.D., 2022a. Metabolic changes in aging humans: current evidence and
 1598 therapeutic strategies. *J. Clin. Invest.* 132. <https://doi.org/10.1172/JCI158451>
- 1599 Palmer, A.K., Jensen, M.D., 2022b. Metabolic changes in aging humans: current evidence
 1600 and therapeutic strategies. *J. Clin. Invest.* 132. <https://doi.org/10.1172/JCI158451>
- 1601 Pandey, U.B., Nichols, C.D., 2011. Human disease models in *drosophila melanogaster* and
 1602 the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, 411–436.
 1603 <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- 1604 Piper, M.D.W., Partridge, L., 2018. *Drosophila* as a model for ageing. *Biochim. Biophys.*
 1605 *acta. Mol. basis Dis.* 1864, 2707–2717. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2017.09.016>
- 1606 Rambabu, L., Megson, I.L., Eddleston, M., 2019. Does oxidative stress contribute to toxicity
 1607 in acute organophosphorus poisoning?—a systematic review of the evidence. *Clin.*
 1608 *Toxicol.* <https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1693589>
- 1609 Scully, L.R., Bidochka, M.J., 2006. Developing insect models for the study of current and
 1610 emerging human pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 1–9.
 1611 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00388.x>
- 1612 Sharma, G.N., Gupta, G., Sharma, P., 2018. A comprehensive review of free radicals,
 1613 antioxidants, and their relationship with human ailments. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene*
 1614 *Expr.* <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018022258>
- 1615 Skoupilová, H., Michalová, E., Hrstka, R., 2018. Ferroptosis as a New Type of Cell Death
 1616 and its Role in Cancer Treatment. *Klin. Onkol.* 31, 21–26.
 1617 <https://doi.org/10.14735/AMKO20182S21>
- 1618 Song, S., Tchkonja, T., Jiang, J., Kirkland, J.L., Sun, Y., 2020. Targeting Senescent Cells for

- 1619 a Healthier Aging: Challenges and Opportunities. *Adv. Sci.* (Weinheim, Baden-
1620 Württemberg, Ger. 7. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202002611>
- 1621 Steinhorn, R.H., Lakshminrusimha, S., 2020. Oxygen and pulmonary vasodilation: The role
1622 of oxidative and nitrosative stress. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 101083.
1623 <https://doi.org/10.1016/j.siny.2020.101083>
- 1624 Sun, S., Shen, J., Jiang, J., Wang, F., Min, J., 2023. Targeting ferroptosis opens new avenues
1625 for the development of novel therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8.
1626 <https://doi.org/10.1038/S41392-023-01606-1>
- 1627 Sun, Y., Yolitz, J., Wang, C., Spangler, E., Zhan, M., Zou, S., 2013a. Aging Studies in
1628 *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol. Biol.* 1048, 77. [https://doi.org/10.1007/978-1-](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_7)
1629 [62703-556-9_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_7)
- 1630 Sun, Y., Yolitz, J., Wang, C., Spangler, E., Zhan, M., Zou, S., 2013b. Aging studies in
1631 *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol. Biol.* 1048, 77–93. [https://doi.org/10.1007/978-](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_7)
1632 [1-62703-556-9_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_7)
- 1633 Sun, Y., Zheng, Y., Wang, C., Liu, Y., 2018. Glutathione depletion induces ferroptosis,
1634 autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death*
1635 *Dis.* 2018 97 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0794-4>
- 1636 Tang, X., Zhou, B., 2013. Ferritin is the key to dietary iron absorption and tissue iron
1637 detoxification in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 27, 288–298.
1638 <https://doi.org/10.1096/FJ.12-213595>
- 1639 Tatar, Ş., Türkmenoğlu, Y., 2020. Investigation of antioxidant responses in *Gammarus pulex*
1640 exposed to Bisphenol A. *Environ. Sci. Pollut. Res.* [https://doi.org/10.1007/s11356-020-](https://doi.org/10.1007/s11356-020-07834-0)
1641 [07834-0](https://doi.org/10.1007/s11356-020-07834-0)
- 1642 Tolwinski, N.S., 2017. Introduction: *Drosophila*—A Model System for Developmental
1643 Biology. *J. Dev. Biol.* 5. <https://doi.org/10.3390/JDB5030009>
- 1644 Toyokuni, S., Yanatori, I., Kong, Y., Zheng, H., Motooka, Y., Jiang, L., 2020. Ferroptosis at
1645 the crossroads of infection, aging and cancer. *Cancer Sci.* 111, 2665–2671.
1646 <https://doi.org/10.1111/CAS.14496>
- 1647 Tsurumi, A., Li, W.X., 2020. Aging mechanisms—A perspective mostly from *Drosophila*.
1648 *Adv. Genet.* 1. <https://doi.org/10.1002/GGN2.10026>
- 1649 Ugur, B., Chen, K., Bellen, H.J., 2016. *Drosophila* tools and assays for the study of human
1650 diseases. *DMM Dis. Model. Mech.* <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>
- 1651 Ursini, F., Maiorino, M., 2020a. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and
1652 GPx4. *Free Radic. Biol. Med.* 152, 175–185.

- 1653 <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.02.027>
- 1654 Ursini, F., Maiorino, M., 2020b. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and
1655 GPx4. *Free Radic. Biol. Med.* 152, 175–185.
- 1656 <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.02.027>
- 1657 Wang, M.C., Bohmann, D., Jasper, H., 2003. JNK signaling confers tolerance to oxidative
1658 stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* 5, 811–816.
- 1659 [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00323-X)
- 1660 Ward, R.J., Zucca, F.A., Duyn, J.H., Crichton, R.R., Zecca, L., 2014. The role of iron in brain
1661 ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet. Neurol.* 13, 1045.
- 1662 [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70117-6)
- 1663 Yang, W.S., Stockwell, B.R., 2016. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell*
1664 *Biol.* 26, 165–176. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.10.014>
- 1665 Yang, Y., Wang, D., Hou, W., Li, H., 2023. Cognitive Decline Associated with Aging. *Adv.*
1666 *Exp. Med. Biol.* 1419, 25–46. https://doi.org/10.1007/978-981-99-1627-6_3
- 1667 Ying, J.-F., Lu, Z.-B., Fu, L.-Q., Tong, Y., Wang, Z., Li, W.-F., Mou, X.-Z., 2021. The role of
1668 iron homeostasis and iron-mediated ROS in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 11, 1895.
- 1669 Zeidan, R.S., Han, S.M., Leeuwenburgh, C., Xiao, R., 2021. Iron homeostasis and organismal
1670 aging. *Ageing Res. Rev.* 72, 101510. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101510>
- 1671 Zhang, W.X., Li, Y., Ke, D., Gao, Y.R., Fei, T., Wang, G.Q., Shu, Y., Wang, J.H., 2023.
1672 GSH-depleting metal–polyphenol-network nanoparticles with dual enzyme activities
1673 induce enhanced ferroptosis. *Biomater. Sci.* 11, 6906–6918.
- 1674 <https://doi.org/10.1039/D3BM01000G>
- 1675 Zheng, J., Mutcherson, R., Helfand, S.L., 2005. Calorie restriction delays lipid oxidative
1676 damage in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 4, 209–216.
- 1677 <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2005.00159.X>
- 1678