UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

NARIANI ROCHA SARAIVA

INTERAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO FERRO (II) E UM MODELO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β-AMILOIDE EM *Caenorhabditis elegans*

Uruguaiana
2023

NARIANI ROCHA SARAIVA

INTERAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO FERRO (II) E UM MODELO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β-AMILOIDE EM *Caenorhabditis elegans*

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

Orientador(a): Daiana Silva de Ávila

Uruguaiana
2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S243i Saraiva, NARIANI ROCHA SARAIVA
INTERAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO FERRO (II) E UM MODELO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO -AMILOIDE EM Caenorhabditis elegans / NARIANI ROCHA SARAIVA Saraiva.
63 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2023.
"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. neurodegeneração . 2. alzheimer . 3. Caenorhabditis elegans . 4. ferro . 5. demencia . I. Título.

NARIANI ROCHA SARAIVA

INTERAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO FERRO (II) E UM MODELO DE AGREGAÇÃO DO PEPTÍDEO β-AMILOIDE EM *Caenorhabditis elegans*

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

Dissertação defendida e aprovada em: 27, abril e 2023.

Banca examinadora:

_____

Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila

Orientadora

UNIPAMPA

_____

Profa. Dra Nadja Schroder

UFRGS

_____

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel

UNIPAMPA

Assinado eletronicamente por **DAIANA SILVA DE AVILA**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/06/2023, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

Assinado eletronicamente por **ROBSON LUIZ PUNTEL**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/06/2023, às 13:13, 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 **1166345** e o código CRC **B163007D**.

Dedico esse trabalho a todos que me deram

suporte para realiza-lo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a oportunidade de estar aqui na terra realizando este trabalho e aos (as) que vieram antes de mim, abrindo esse espaço para que todos pudessem fazer pesquisa. Segundo a minha orientadora Daiana Ávila, por incansavelmente dar o suporte necessário para a realização de qualquer trabalho científico. A minha família, principalmente a minha mãe Bete e ao meu irmão Uillian, pelo constante esforço e incentivo em me manter estudando e alcançar o tão desejado título de mestre, além de todo o suporte afetivo. A minha namorada Roberta por estar sempre me amando, me apoiando nas minhas escolhas e incentivando a ser melhor. Aos meus queridos filhos Vênus e Léo pelos seus constantes carinho, lambeijos e brincadeiras. Agradeço a todos os integrantes do GBToxCe durante esses sete anos de lab, saibam que foram essenciais para construir um ambiente ideal para fazer pesquisa além de proporcionarem muito aconchego, amizade e parceria, sempre amei o laboratório <3.

A UNIPAMPA pela oportunidade e suporte.

A CAPES, pela concessão de uma bolsa de estudos.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência no mundo, sendo classificada como uma doença neurodegenerativa progressiva com a idade, acometendo principalmente pessoas acima dos 60 anos e não possui cura. Suas principais características patológicas são a formação de agregados amiloides extracelulares e a agregação da proteína tau intracelular, entretanto existem outras teorias sobre o seu desenvolvimento. Por exemplo, alterações na homeostase do metal essencial Ferro (Fe), como o aumento da concentração de Fe no cérebro dos pacientes. Uma alta concentração de Fe livre tem a capacidade de causar danos oxidativos através da reação de Fenton e levar à ferroptose. Para avaliar se uma única exposição precoce ao sulfato de Fe(II) seria capaz de causar alterações na agregação amilóide. utilizamos cepas transgênicas do modelo biológico *Caenorhabditis elegans* que apresentam expressão do peptídeo β-amiloide humano nas células musculares para expor a diferentes concentrações de Sulfato de Fe (II) (0,5, 1, 2 e 3mM), avaliando o papel desse elemento na agregação do peptídeo e que resulta no fenótipo de paralisia. Também foi avaliada a sobrevivência, longevidade, espécies reativas de oxigênio (ROS) e parâmetros natatórios de velocidade média e distância percorrida. A exposição às maiores concentrações foi capaz de aumentar o fenótipo de paralisia e a produção de ROS, diminuir a sobrevivência e a longevidade, além de prejudicar os parâmetros natatórios. Sendo assim, é possível concluir que uma exposição a altas concentrações de Fe possui a capacidade de acelerar o fenótipo de paralisia e aumentar o estresse oxidativo, porém sem alterar o número de agregados do peptídeo β-amilóide em *Caenorhabditis elegans*.

Palavras-Chave: demência, sulfato de ferro (II), Doença de Alzheimer, agregação amiloide

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia in the world, being classified as a progressive neurodegenerative disease with age, affecting mainly people over 60 years of age and has no cure. Its main pathological characteristics are the formation of extracellular amyloid aggregates and the aggregation of intracellular tau protein, however there are other theories about its development. For example, alterations in the homeostasis of the essential metal Iron (Fe), such as an increase in the concentration of Fe in the brain of patients. A high concentration of free Fe has the ability to cause oxidative damage through the Fenton reaction and lead to ferroptosis. To assess whether a single early exposure to Fe (II) sulfate would be able to cause changes in amyloid aggregation we used transgenic strains of the biological model *Caenorhabditis elegans* that show human β-amyloid peptide expression in muscle cells to expose them to different concentrations of Fe (II) sulfate (0.5, 1, 2 and 3mM), evaluating the role of this element in aggregation of the peptide and which results in the paralysis phenotype. Survival, longevity, reactive oxygen species (ROS) and swimming parameters of average speed and distance covered were also evaluated. Exposure to the highest concentrations was able to increase the paralysis phenotype and ROS production, decrease survival and longevity, and impair swimming parameters. Therefore, it is possible to conclude that exposure to high concentrations of Fe has the ability to accelerate the paralysis phenotype and increase oxidative stress, but without changing the number of β-amyloid peptide aggregates in *Caenorhabditis elegans*.

.

Keywords: dementia, iron(II) sulfate, Alzheimer's disease, amyloid aggregation

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se estruturada em três partes:

1° PARTE: as seções introdução, revisão bibliográfica, justificativa e objetivos geral e específicos.

2° PARTE: os resultados que compõem o presente trabalho serão apresentados no formato de artigo científico, estando as seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão contidas no manuscrito. O manuscrito o qual faz parte desta dissertação encontra-se estruturado no mesmo formato no qual será submetido à revista *Molecules.*

3° PARTE: nesta seção encontram-se as conclusões do presente trabalho bem como perspectivas futuras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Absorção de ferro pelo enterócito duodenal

Figura 2. Reação de Fenton.

Figura 3. Representação da via amiloidogênica e agregação amilóide, que resultam no aumento de ROS e Fe livre levando a ferroptose.

Figura 4. Ciclo de reprodução do *C. elegans*.

LISTA DE SIGLAS

APL-1- Proteína percursora amilóide 1

ApoE- Apoliproteína E4

APP- Proteína Percursora amilóide

ATP- Adenosina Trifosfato

Aβ- Peptídeo beta-amilóide

DA- Doença de Alzheimer

DMT1- Transportador de metal divalente 1

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EROs- Espécies reativas de oxigênio

Fe- Ferro

GFP- proteína verde fluorescente

GLP-1- peptídeo semelhante ao glucagon

GPX- Glutationa

GPX4- Glutationa peroxidase-4

IREs- Elementos responsivos ao ferro

IRPs- Proteínas responsivas ao ferro

mtDNA- DNA mitocondrial

NFκβ- Fator nuclear kappa beta

NMDA- N-metil D-aspartato

PSEM1- Preniselina 1

PTL-1- Proteína com repetições tipo tau

RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro

Trf1- Transferrina

CaEDTA- etilenodiaminotetra-acetato de cálcio dissódico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
2. REVISÃO NA LITERATURA 12
2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER 13
2.2. FERRO 16
2.3 Caenorhabditis elegans 22
3. JUSTIFICATIVA 26
4. OBJETIVOS 27
4.1 Objetivos gerais 27
4.2 Objetivos específicos 27
5. MANUSCRITO 28
6. CONCLUSÕES 55
7. PERSPECTIVAS 55
8. REFERÊNCIAS 57

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo de demência mais comum no mundo e é caracterizada como uma doença neurodegenerativa progressiva com a idade. É conhecida como uma doença do envelhecimento que causa declínio cognitivo, perda de memória e diminuição da massa encefálica devido a morte neuronal (Mangialasche *et al.*, 2010). Essa doença se apresenta em duas diferentes formas, sua forma esporádica, que acomete pessoas a partir dos 60, e sua forma genética ou familiar que acomete pessoas as partir dos 20 anos. Seus principais marcadores histológicos são a agregação extracelular do peptídeo β-amiloide, o qual forma as placas senis e a hiperfosforilação da proteína tau, que forma os emaranhados neurofibrilares. As placas amilóides impedem a sinalização entre neurônios, levando a uma disfunção neuronal, neuroinflamação e morte neuronal. Já os emaranhados neurofibrilares impedem a sinalização intracelular (Tönnies e Trushina, 2017; Viola e Klein, 2015). Essas duas proteínas insolúveis causam alterações na homeostasia celular e morte neuronal.

Outra alteração observada em pacientes que possuem a DA é a alteração na homeostasia do ferro (Fe) (Chen *et al.*, 2023). Por se tratar de um metal essencial, é necessário para diferentes finalidades, sendo muitas delas diretamente associadas ao cérebro, como a síntese de mielina, de neurotransmissores, respiração celular, entre outros. Além disso, por possuir um grande papel na respiração celular é amplamente encontrado no cérebro, devido a necessidade metabólica desse órgão (Greenough, Camakaris e Bush, 2013). Entretanto, uma alteração na sua homeostasia pode levar ao aumento da sua fração livre, a qual apresenta um grande perigo para a integridade neuronal, pois possui a capacidade de reagir com o peróxido de hidrogênio, levando a uma produção em cadeia de espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton (Farina *et al.*, 2013). Além disso, altas concentrações Fe livre causam neuroinflamação e peroxidação lipídica e esses dois fatores juntos levam à ferroptose, o que também traz danos e morte neuronal (Belaidi e Bush, 2016b; Stockwell *et al.*, 2017).

Contudo, ainda não se sabe se o acúmulo de Fe é um evento primário, ou secundário na DA, mas sabe-se que o aumento das concentrações de Fe no cérebro ocorre com o avanço da idade (Greenough, Camakaris e Bush, 2013; Hagemeier, Geurts e Zivadinov, 2012). Para avaliar os efeitos de uma única exposição precoce ao Fe na sobrevivência, longevidade, parâmetros natatórios, paralisia e agregação amiloide nós utilizamos o nematoide *Caenorhabditis elegans*, o qual possui alta homologia genética com humanos (60-80%) e 40% de genes homólogos a doenças humanas (Morcos e Hutter, 2009). Esse modelo também apresenta um ciclo de vida curto, possibilitando avaliar os efeitos do Fe na longevidade do verme. Além disso, possui um genoma completamente sequenciado, permitindo a construção de diferentes cepas. Dentre essas, estão as cepas que apresentam expressão o peptídeo β-amiloide humano nos músculos do verme conforme o animal envelhece, possibilitando assim, avaliar os efeitos de diferentes xenobióticos e moléculas de interesse na agregação amiloide (Caldwell, Willicott e Caldwell, 2020).

Sendo assim, a utilização do *C. elegans* para avaliar os efeitos tóxicos do Fe após uma única exposição precoce é uma grande ferramenta, possibilitando a avaliação de parâmetros toxicológicos e seus efeitos na agregação amiloide.

2. REVISÃO NA LITERATURA

2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER

Descrita pela primeira vez no início do século XX por Alois Alzheimer, a doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva, a qual aumenta a sua prevalência conforme o avanço do envelhecimento do indivíduo. Classificada como uma doença neurodegenerativa e a demência mais comum ao redor do mundo, chega a acometer mais de 30 milhões de pessoas. Em seus casos esporádicos ou de início tardio, os fatores ambientais, genéticos e de estilo de vida influenciam em seu desenvolvimento, sendo, portanto, uma doença multifatorial desenvolvida principalmente em pessoas com mais de 60 anos (Alexander, Marfil e Li, 2014). Essa patologia também pode ocorrer em sua forma precoce, sendo esse subgrupo da doença conhecida como a DA familiar ou de início precoce, onde estão envolvidos principalmente fatores genéticos como o polimorfismo do gene ApoE no alelo 4 (ApoE4) e as mutações nos genes da presenilina (PSEN1/2) e na proteína percursora amiloide (APP) que são componentes do complexo proteico da α-secretase e é a maior causa de DA precoce (Li *et al.*, 2019; Tiwari *et al.*, 2019; Villain e Dubois, 2019).

Os principais sintomas incluem o declínio da memória, comprometimento do pensamento, da cognição e da capacidade de realizar atividades diárias de maneira independente, dificuldade para comunicação, desorientação, entre outros (Gale, Acar e Daffner, 2018). Também apresenta como características fisiopatológicas a perda maciça da massa encefálica, a qual é resultado da perda neuronal causadas pelos seus agregados insolúveis, que dificultam a transmissão sináptica e o transporte de organelas intracelulares (Viola e Klein, 2015). Essa perda neuronal ocorre devido a dois tipos de agregados insolúveis, um intracelular e o extracelular. Os agregados intracelulares, chamados de emaranhados neurofibrilares, são resultado da hiperfosforilação da proteína tau. Já os agregados extracelulares são formados pela agregação do peptídeo β-amiloide, o qual possui forma de dímeros, oligômeros, e então se agregam na forma de fibrilas, conhecidas como placas senis. Juntos, o β-amiloide e os emaranhados neurofibrilares são considerados os maiores responsáveis pelo desenvolvimento da DA.

A proteína Tau possui como função a estabilização dos microtúbulos celulares, sendo que estes são responsáveis pala sustentação da estrutura celular. A presença dessa proteína nos microtúbulos permite a formação de extensões celulares citoplasmáticas e na sua ausência essas extensões não ocorrem (Avila *et al.*, 2004). A fosforilação da Tau no citoplasma normalmente possui dois resíduos de aminoácidos fosforilados, sendo essa fosforilação a responsável pela ligação da tau aos microtúbulos ou a membrana celular. Em condições patológicas uma grande quantidade de resíduos dessa proteína são fosforilados, dando à proteína Tau a capacidade de se auto agregar (Avila *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, as placas senis são produtos da agregação de oligômeros amiloides, esses são formados a partir da APP, uma proteína integral da membrana plasmática que em condições patológicas são clivados pela β-secretase e γ-secretase, produzindo o peptídeo β-amiloide, e em condições não patológicas são clivadas pela α-secretase e γ-secretase, produzindo o P3, o qual é solúvel e possui envolvimento na sinalização sináptica (Tiwari *et al.*, 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre qual é a função da APP e alguns estudos relatam a sua capacidade de moderar a sobrevivência celular, crescimento, motilidade, juntamente com o crescimento e funções de neuritos (Dawkins e Small, 2014; Tiwari *et al.*, 2019).

Atualmente, a DA não possui uma cura, apenas tratamentos sintomáticos, visando diminuir os sintomas da doença. Isso pode ocorrer devido ao tempo de diagnóstico inadequado, drogas não eficazes e alvos farmacológicos não ideais (Viola e Klein, 2015). Existem duas classes de medicamentos para o tratamento sintomático da DA, sendo eles os inibidores da acetilcolinesterase e antagonistas da *N*-metil-D-aspartato. São inibidores da acetilcolinesterase a donepezila, rivastigmina e a galantamina. Esse mecanismo baseia-se na hipótese colinérgica da DA, a qual considera que o β-amiloide causa uma redução na recaptação da colina, que é essencial para a síntese da acetilcolina. Pacientes com a DA possuem uma grande neurodegeneração dos neurônios colinérgicos, os quais possuem papel essencial na memória, atenção, aprendizagem e outras funções. Porém, como já mencionado, é um tratamento profilático, sem efeitos na inibição do desenvolvimento da doença (Breijyeh e

Karaman, 2020a). A outra classe, baseia-se na hipótese de que os receptores NMDA estão hiperestimulados na DA resultando em excitotoxicidade, disfunção sináptica, morte neuronal e declínio nas funções cognitivas. O medicamento utilizado para essa hiperestimulação é o antagonista dos receptores NMDA, a memantina(Breijyeh e Karaman, 2020b). Entretanto, esses medicamentos já foram suspensos na França em 2018, pois, após uma década de uso não apresentou evidência de efeitos clínicos significativos (Walsh *et al.*, 2021).

Atualmente existem vários medicamentos em desenvolvimento com diferentes alvos farmacológicos, dentre eles inibidores da agregação da proteína Tau, a vacina amiloide induzindo a produção de anticorpos contra o peptídeo β-amiloide, moduladores da alfa-secretase e o Aducanumab, um anticorpo monoclonal anti-β-amiloide (Breijyeh e Karaman, 2020b; Salloway *et al.*, 2022). Alguns pesquisadores consideram o aducanumab uma falsa esperança, uma vez que há controvérsias sobre a liberação desse medicamento pela FDA para todas as fases da doença, pois não se sabe ao certo se a depuração do β-amiloide protege de fato o paciente do declínio funcional e cognitivo, sendo que nos estudos clínicos foram incluídos apenas os pacientes no estado precoce da doença (Walsh *et al.*, 2021).

A incapacidade de resposta aos fármacos deve-se muitas vezes por estes não atacarem mecanismos chave no desenvolvimento e progressão da doença. Um desequilíbrio na homeostase local do microambiente em que as células da micróglia estão presentes pode causar a ativação destas. Por exemplo, o depósito do β-amiloide entre dois neurônios saudáveis pode interromper a sinalização entre eles e iniciar uma resposta imune, levando à neuroinflamação, consequentemente causando danos aos neurônios e ao redor (McCarthy *et al.*, 2016; Revi, 2020). O acúmulo de Fe foi correlacionado com a neuroinflamação, possuindo a capacidade de induzir a ativação das células da glia através da liberação de fatores pró-inflamatórios mediada por NFκβ. McCarthy et al. (2018) demonstrou que as células da micróglia quando expostas ao β-amiloide aumentam a expressão das proteína transportadora de Fe DMT-1 e da H-ferritina, sugerindo que a micróglia age limpando o excesso de Fe extracelular quando recrutada para as placas contento o β-amiloide durante a resposta neuroinflamatória da doença (McCarthy *et al.*, 2018). Existem evidências de que

em associação com os emaranhados neurofibrilares e com os agregados amiloides está incluso o Fe. Estudos demonstram que este metal promove a agregação e oligomerização, aumentando a toxicidade dos agregados, contribuindo assim com a morte neuronal (Belaidi e Bush, 2016a; Peng, Chang e Lang, 2021). Também existem evidências de que o Fe^{3+} liga-se a resíduos de histidina presentes nos agregados amilóides e que o Fe^{2+} liga-se ao *N*-terminal inibindo a estrutura helicoidal do β-amiloide, elevando o número de folhas betas (Chen *et al.*, 2023). Outros estudos evidenciam que células ricas em Fe estimulam a expressão da APP através da proteína estimuladora de ferro (IRP1) (Chen *et al.*, 2023; Peng, Chang e Lang, 2021; Zhou e Tan, 2017). Corroborando com estas evidências, estudos demonstram a capacidade de quelantes de Fe, como a deferroxamina, para diminuir a neuroinflamação em ratos modelo para a DA, através da troca do estado da micróglia proinflamatória M1 para a sua forma antinflamatória M2. Além disso, também possui a capacidade de diminuir a agregação amilóide e inibição da apoptose no cérebro desse modelo (Chen *et al.*, 2023; Zhang e He, 2017). Entretanto, o uso prolongado de quelantes pode resultar em efeitos adversos e a maioria deles não consegue ultrapassar a barreira cérebro sangue, sendo necessário o desenvolvimento de novos quelantes com melhor eficácia (Chen *et al.*, 2023).

A alteração na homeostase do Fe também pode ocorrer por aumento na exposição a este metal. Estudos apontam que a exposição a elevados níveis de Fe pode acelerar a produção e a agregação do peptídeo beta-amilóide, aumenta expressão da APP/presenilina, altera expressão de transportadores de metais e induz estresse oxidativo (Becerril-Ortega *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2019; Turner, Hojat e Gonnella, 1987). Desta forma, alterações na homeostase do ferro podem estar envolvidas no desenvolvimento e progressão da DA nas formas familiar e idiopática ou ambiental. Sendo assim, mais estudos são necessários para entender o papel da exposição ao ferro no desenvolvimento da DA.

2.2. FERRO

O Ferro (Fe) é classificado como um micronutriente essencial devido às suas características específicas, sendo o metal de transição mais presente no corpo humano. Este elemento é necessário para a manutenção da vida em diferentes organismos. Sua capacidade redox auxilia as metaloproteínas e enzimas metabólicas em suas atividades, doando ou recebendo elétrons. Também torna possível o transporte de oxigênio pela sua presença no grupamento heme na hemoglobina das hemácias, além de outras funções essenciais, como: a síntese de neurotransmissores, síntese de ATP, mielinização, sendo um metal abundante no cérebro devido a necessidade energética deste (Daglas e Adlard, 2018b; Wang e Babitt, 2019). Uma deficiência de ferro prejudica a proliferação celular, o transporte de oxigênio e é o principal responsável pelas causas de anemia (Pasricha *et al.*, 2021). A quantidade total de ferro em um corpo humano adulto é de 3 a 5g de ferro, sendo essencial todo um sistema de absorção, armazenamento e transporte para não deixar esse micronutriente livre nos diferentes sistemas e causar danos (Belaidi e Bush, 2016a).

A absorção do Fe ocorre no duodeno, onde o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} pela enzima DCYTB (proteína semelhante ao citocromo B duodenal), presente nas microvilosidades dos enterócitos para então ser transportado para dentro da célula pelo transportador de metal divalente 1 (DMT1). Quando dentro da célula, o Fe está presente no citosol como um pool lábil de Fe e pode ser destinado para a mitocôndria, para síntese do heme, ou então novamente oxidado a Fe^{3+} com destino a ferritina para ser armazenado (Butler, 1992; Salloway *et al.*, 2022). Outras formas de armazenamento são os lisossomos com a ferritina e a hemossiderina (Peng, Chang e Lang, 2021). O responsável pelo transporte do ferro para fora das células é a ferroportina e antes de ser transportado precisa ser oxidado pela ceruloplasmina ou outras ferroxidases e então transferido para a transferrina (TfR1) para ser distribuído para os tecidos pelo sangue.

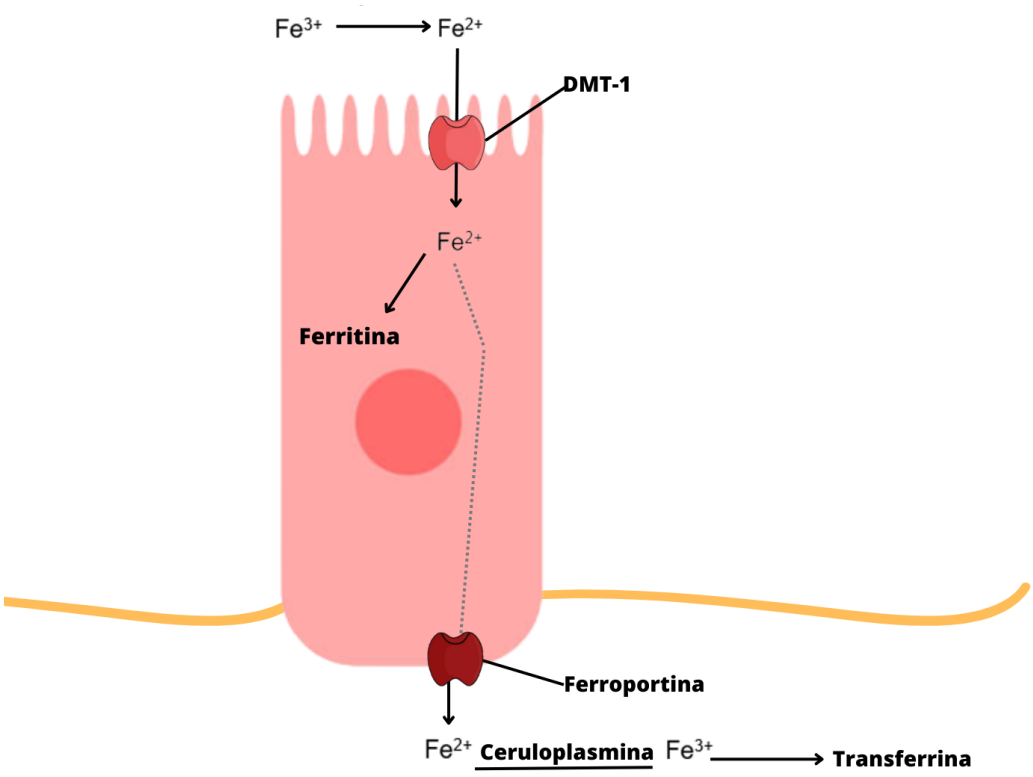


Figura 1. Absorção de ferro pelo enterócito duodenal. O Fe^{3+} para ser absorvido é oxidado a Fe^{2+} pela proteína semelhante a citocromo B duodenal (DCYTB) e então absorvido pelo transportador de metal divalente (DMT-1), sendo temporariamente armazenado na ferritina, ou já exportado pela ferroportina. Após exportado o Fe^{2+} vai ser reduzido pela Ceruloplasmina a Fe^{3+} e então transferido para transferrina para ser distribuída aos diferentes tecidos. (Fonte: própria autora)

Em mamíferos, a homeostasia celular do ferro é controlada tanto a nível de tradução dos RNAm, quanto a nível pós transcricional através de dois sensores de ferro citosólico, as proteínas reguladoras de ferro (IRPs) IRP1 e IRP2. Essas proteínas se ligam aos elementos responsivos ao ferro (IREs), localizados nas regiões não traduzidas dos RNAm que codificam proteínas envolvidas na captação do ferro, armazenamento e transporte (Anderson *et al.*, 2012; Peng, Chang e Lang, 2021). Quando a célula está deficiente em ferro, os IRPs ligam-se ao IRE 5' do RNAm da ferritina e ferroportina com alta afinidade para reprimir a sua tradução, e liga-se ao IRE 3' do RNAm da TfR1 para bloquear a sua degradação. Já quando o ferro está em excesso, os IRPs não ligam-se aos IREs, aumentando a síntese da ferritina e da ferroportina, promovendo a degradação do RNAm do TRf1. Essa regulação coordenada da célula permite que ocorra uma absorção adequada de acordo com as necessidades do

organismo, sem chegar aos níveis tóxicos (Anderson *et al.*, 2012; Peng, Chang e Lang, 2021).

No cérebro, o Fe é encontrado nos gânglios basais, nas células da glia, na *substancia nigra*, no núcleo vermelho, no giro denteado cerebelar, no córtex cerebral, na substância negra, medula oblonga e nas células endoteliais de capilares do cérebro (Jiang *et al.*, 2017). O cérebro é um órgão que necessita de uma grande quantidade desse metal para manter as suas necessidades básicas, devido a demanda energética alta. No envelhecimento saudável, o acúmulo de ferro ocorre em várias regiões do cérebro, sendo principalmente estocado na ferritina e na neuromelanina (Belaidi e Bush, 2016a; Ward *et al.*, 2014). Entretanto, acredita-se que o envelhecimento acarreta em prejuízos na regulação da homeostase do Fe e que esse excesso acaba não sendo complemente armazenado de maneira segura, deixando alguma quantidade de Fe intracelular livre. Esse aumento nas concentrações de Fe intracelular pode ser devido a vários fatores, sendo eles, o aumento da permeabilidade da barreira cérebro sangue, inflamação, redistribuição do Fe no cérebro e, como já mencionado anteriormente, alterações na homeostase do cérebro (Ward *et al.*, 2014).

Como já foi descrito anteriormente, o corpo humano precisa de todo um sistema para não deixar nenhuma forma de Fe livre, evitando assim, danos celulares. Entretanto, quando encontrado em sua forma livre, o ferro pode reagir catalisando a produção de espécies reativas de oxigênio causando danos ao DNA, proteínas e lipídeos (Wang e Babitt, 2019). Esse fenômeno ocorre principalmente pela atividade redox do Fe, onde o íon ferroso Fe^{2+} é oxidado pelo peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton (1), formando ferrico Fe^{3+}, um radical hidroxila e uma hidroxila (Fig. 2) (Koppenol e Hider, 2019). Na segunda etapa dessa reação (2) o Fe^{3+} vai ser reduzido pelo peróxido de hidrogênio a Fe^{2+} , produzir um o radical hidroperoxila e mais um próton H^{+} Essa reação pode gerar um ciclo vicioso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como pode-se observar na figura 1 (Pal *et al.*, 2022). A produção EROs tem a capacidade de danificar o DNA, mtDNA, afetar a expressão do DNA, oxidar as proteínas e levar a peroxidação de lipídeos de membrana. As ERO podem induzir a liberação do Fe das suas proteínas de armazenamento e do Fe

presente nas proteínas mitocondriais (Ward *et al.*, 2014). Esse Fe livre vai novamente sofrer a reação de Fenton e essa produção de EROs vai levar a um desenvolvimento mais rápido de uma neurodegeneração, como ocorre na DA (E e E, 2017). Essa produção de EROs pode levar à morte celular por apoptose ou por ferroptose, sendo esta última um tipo de morte celular dependente de ferro (Peters, Connor e Meadowcroft, 2015).

$$(1)\ Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$$

$$(2)\ Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + \bullet OOH + H^+$$

Figura 2. Reação de Fenton (Fonte: própria autora)

Diferente da necrose e da apoptose, a ferroptose é induzida por uma alta concentração de Fe e também existem evidências sobre o seu envolvimento com a DA. Nesse tipo de morte celular, o excesso de Fe^{2+} livre induz a ferroptose através da geração de espécies reativas produzidas pela reação de Fenton e peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular. O sistema antioxidante possui uma importante ação reguladora da ferroptose. A glutationa peroxidase 4 (GPX4) tem a capacidade de catalisar a redução de peróxidos lipídicos aos seus álcoois correspondentes com a glutationa (GSH) como agente redutor, não deixando a ferroptose acontecer (Peters, Connor e Meadowcroft, 2015).

O conhecimento de que ocorrem mudanças químicas nas concentrações de Fe em pacientes com a DA já é antigo, sendo uma das primeiras descobertas relatadas em cérebros com a DA em 1953 e 1960 (Hallgren e Sourander, 1960). Como mencionado anteriormente, o Fe está presente tanto nos emaranhados neurofibrilares, como nas placas senis, sendo encontrado uma grande quantidade de ferro em cérebros pós-mortem de pacientes que possuíam a DA (James *et al.*, 2017). Existem evidências *in vitro* da indução da agregação dessas proteínas quando na presença de Fe (Ayton, James e Bush, 2017). Desta maneira, o aumento de Fe é correlacionado com o aumento da quantidade de placas amilóides, já possuindo resultados demonstrando a severidade da DA com os depósitos de Fe (Du *et al.*, 2018). Scott Ayton et al (2014) demonstrou

que a elevação da ferritina no fluído cerebroespinal estava negativamente envolvida com o declínio cognitivo e com a progressão desse declínio para a DA. Além disso, esses altos níveis de ferritina apresentaram correlação com o alelo APOε-4 (Ayton *et al.*, 2015; Ayton, Diouf e Bush, 2018). Também existem evidências de que a APP diminui a concentração de ferro intraneuronal através da estabilização da ferroportina na membrana celular, demonstrando o seu envolvimento mais direto com a regulação do Fe (McCarthy, Park e Kosman, 2014; Wong *et al.*, 2014). Estudos clínicos já demonstraram a capacidade da deferroxamina, um quelante específico para o Fe, em diminuir a taxa de declínio da memória e a redução da inteligência (McLachlan, Kruck, T. P. A., *et al.*, 1991; McLachlan, Kruck, T. P., *et al.*, 1991). Ainda não se sabe se esse aumento na concentração de ferro é um evento primário ou secundário na DA, mas já existem alguns conhecimentos concretos, como o aumento dos níveis de ferro no cérebro conforme o envelhecimento (Ayton *et al.*, 2021; Spence, McNeil e Waiter, 2022).

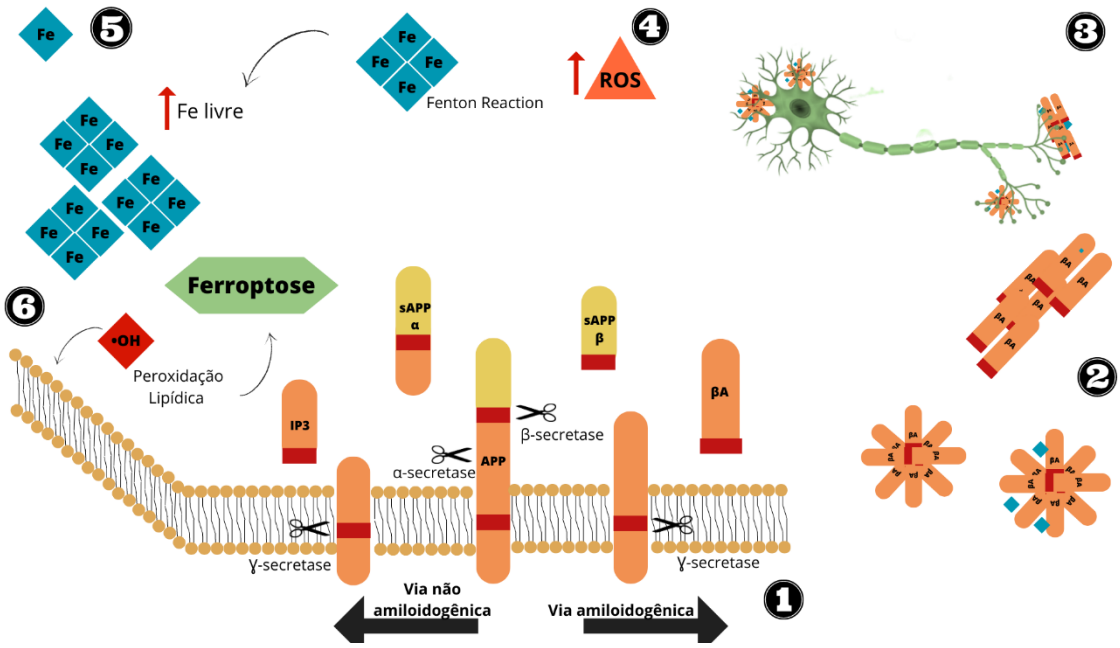


Figura 3. Representação da via amiloidogênica e agregação amilóide, que resultam no aumento de ROS e Fe livre levando a ferroptose. (1) Demonstra a clivagem da proteína APP no processo amiloidogênico e não-amiloidogênico através das enzimas de clivagem α-setretase, β-secretase e ɣ-secretase, resultando (2) na agregação do peptídeo β-amilóide, formando os oligômeros e posteriormente as (3) placas amiloides que se agregam ao redor dos neurônios impedindo a sinalização. Esse processo (4) vai aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), (5) liberando ferro (Fe) armazenado em proteínas

intracelulares deixando ele livre e (6) consequentemente causando peroxidação lipídica e consequente ferroptose. (Fonte: Própria autora).

2.3 *Caenorhabditis elegans*

O nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) foi descoberto e selecionado em 1960 pelo Sydney Brenner como um organismo para modelo biológico e mutações genéticas. Esse pequeno verme é encontrado em matéria orgânica em decomposição, tronco de árvores, solo e em alguns ambientes aquáticos. Possui alta homologia genética com os humanos, em torno de 60-80% e 40% dos genes estão correlacionados com doenças humanas (Kaletta e Hengartner, 2006; Martinez-Finley *et al.*, 2011). Tem como vantagem um corpo transparente e um ciclo de vida curto, além de a maior parte da população ser hermafrodita e assim garantirem a reprodução da própria espécie. A produção espontânea de machos é uma raridade ocorrendo em apenas 0.1% da população. Após o hermafrodita fazer a postura de ovos, este vai eclodir e entrar no seu estágio larval L1. Dentro de 48h o verme vai chegar ao seu estágio larval adulto, e então passar para o seu estágio adulto jovem e começar o seu ciclo reprodutivo. Esse ciclo reprodutivo dura em torno de três dias e após a reprodução inicia-se o processo de envelhecimento do verme. Dependendo das condições laboratoriais, o *C. elegans* pode viver em torno de 21 dias (Culetto e Sattelle, 2000). Devido ao seu ciclo de vida curto, o que possibilita a obtenção de resultados mais rápidos, esse modelo é amplamente utilizado para monitorar o envelhecimento e as alterações consequentes desse processo, assim como, as alterações causadas pela exposição a diferentes xenobióticos (Nicolai *et al.*, 2022). O *C. elegans* possui o seu genoma completamente sequenciado e seus 302 neurônios bem caracterizados, tudo isso contribui para a produção de cepas geneticamente modificadas (Earley *et al.*, 2021). Por possuir o corpo transparente a visualização de cepas com marcações proteicas utilizando a proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein-GFP*) torna-se possível e de fácil quantificação, além disso também possibilita a utilização de diferentes corantes para marcar mitocôndrias, lipídeos, proteínas insolúveis como o β-amilóide.

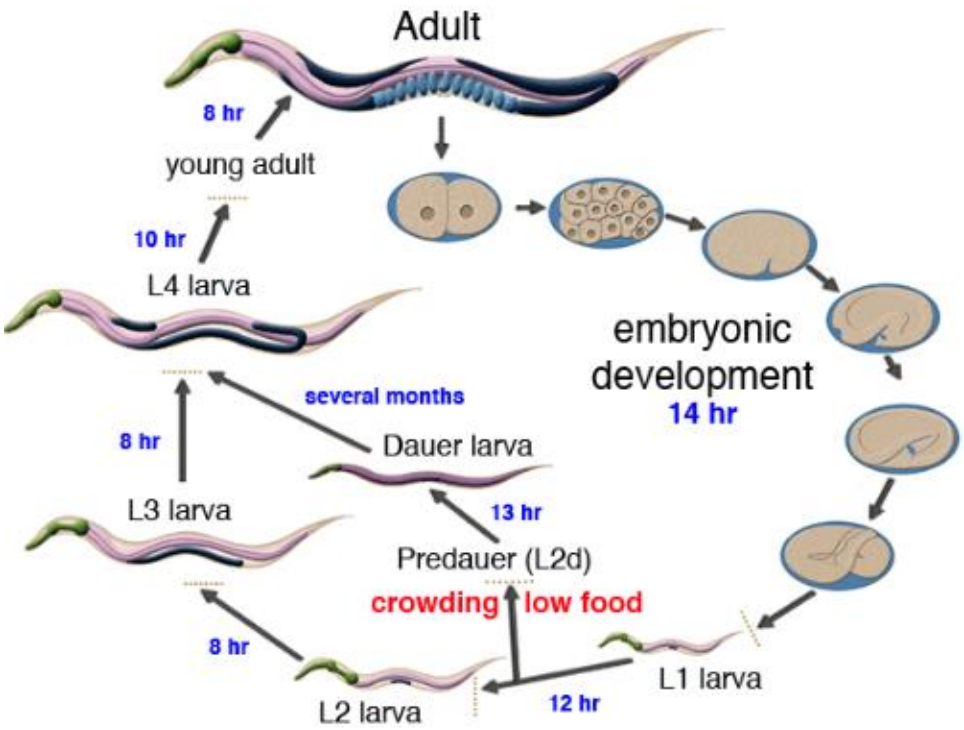


Figura 4. Ciclo de reprodução do *C. elegans* (Fonte: WormAtlas)

Esse pequeno nematoide também é amplamente utilizado para a avaliação de metais, tanto para estudos de toxicidade, como para alterações na sua homeostase (Anderson e Leibold, 2014a; Earley *et al.*, 2021). A exposição a diferentes metais pode causar uma diminuição do tamanho do verme, atraso no desenvolvimento, neurodegeneração, diminuição da taxa de reprodução, além de passar alterações comportamentais para a sua progênie (Lu *et al.*, 2018; Martinez-Finley *et al.*, 2011; Soares, Puntel e Ávila, 2018). Sobre o Fe, existem diferentes resultados sobre os seus efeitos em *C. elegans.* Alguns estudos trazem que a exposição ao Fe causa uma diminuição da sobrevivência e na longevidade, neurodegeneração dopaminérgica e aumenta os níveis de EROS (Almeida Fagundez, De *et al.*, 2015; Soares, Puntel e Ávila, 2018). Também existe uma alta homologia entre o sistema de regulação da absorção, transporte, armazenamento entre o *C. elegans* e humanos (Anderson e Leibold, 2014a). Possuindo a SMF-3 ortólogo a DMT-1, ortólogos a ferritina FTN-1 ou FTN-2, e a ferroportina FPN1.1, FPN1.2 e FPN1.3 Assim como em humanos, em *C. elegans* ocorre o acúmulo de Fe conforme o envelhecimento e leva a produção de

proteínas insolúveis. Esses efeitos podem ser alterados quando o verme é exposto ao etilenodiaminotetra-acetato de cálcio dissódico (CaEDTA), levando a uma diminuição de proteínas insolúveis e das concentrações de Fe conforme o envelhecimento (Klang *et al.*, 2014).

Devido às suas boas características para a pesquisa, o *C. elegans* também foi estabelecido como modelo para a DA, pois possui diferentes proteínas ortólogas envolvidas com o desenvolvimento dessa neurodegeneração. Por exemplo, os genes ortólogos à preniselina *sel-12* (PS1) e *hop-1* (PS2), dois ortólogos a α-secretase *sup-17* (*ADAM10*) e *adm-4* (*ADAM17/TACE*), a proteína tipo tau (*ptl-1*) e a APP (*apl-1*) (Hornsten *et al.*, 2007; Smialowska e Baumeister, 2006). Enquanto as α-secretases SUP-17 e ADM-4, atuam principalmente na clivagem dos homólogos ao Notch LIND-12 e GLP-1 (Alexander, Marfil e Li, 2014), os mutantes da *hop-1*/PSEN em mutantes para a *sel-12*/PSEN mostraram letalidade por efeito materno, defeitos na linhagem germinativa e ausência da faringe anterior (Westlund *et al.*, 1999). O homólogo à proteína tau possui duas isoformas PTL-1A e PTL-1B é expresso na epiderme embriônica, em neurônios mecanosensoriais, e também não apresenta agregação nas fibrilas como a proteína humana (Goedert *et al.*, 1996). Apesar disso, já existem modelos geneticamente modificados que agregam a proteína tau (Natale, Barzago e Diomede, 2020). Em *C. elegans* a Apl-1 é expressa em células de diferentes tecidos, como neurônios, músculos e hipoderme. Essa proteína é essencial para a viabilidade morfológica do verme, seu knockout causou vacúolos no interior do verme em estágio L1 e dificuldade para fazer a muda para o estágio L2. O verme conseguiu sintetizar a cutícula do estágio L2, mas não conseguiu se desprender da cutícula do estágio L1, levando a sua morte. Já o ganho de função dessa proteína causa defeitos no brood size, movimento e viabilidade (Hornsten *et al.*, 2007). Já quando inserida uma única cópia da APP humana em *C. elegans* foi observada uma neurodegeneração progressiva com o envelhecimento (Yi *et al.*, 2017). Entretanto, a *apl-1* não possui a sequência Aβ e nem um ortólogo a β-secretase, o que impede o desenvolvimento da doença naturalmente nesse modelo (Alexander, Marfil e Li, 2014).

Apesar do *C. elegans* não produzir a porção βA da APP e nem a β-secretase, esse nematóide possibilita um poderoso sistema genético *in vivo* para estudar os efeitos neurotóxicos do βA através de análises transgênicas (Alexander, Marfil e Li, 2014). Diferentes tipos de cepas já foram criadas para expressarem o βA em neurônios específicos ou todos os neurônios, e músculo. Sendo essas cepas utilizadas para estudar xenobióticos que induzem a agregação, ou que desagregam o βA (Caldwell, Willicott e Caldwell, 2020; Mccoll *et al.*, 2012).

A partir de 1995 se iniciou a publicação sobre a expressão do peptídeo β-amilóide humano em *C.elegans*. Utilizando o promotor *unc-54* foi possível induzir a expressão deste peptídeo no tecido muscular do verme. Chistopher D link (1996) (Link, 1995) construiu um plasmídeo contendo o minigene β-(1-42) e demonstrou que a cepa CL2006 efetivamente expressa o peptídeo β-amilóide humano, através de ensaios de imuno-histoquímica e marcação com a Thioflavina S, o marcador do β-amilóide já bem conhecido na literatura. Também foi observado que essa cepa recém construída apresentava um fenótipo de paralisia conforme o envelhecimento, sendo sugerido um efeito proveniente da citotoxicidade causada pelo β-amilóide (Griffin, Caldwell e Caldwell, 2017; Link, 1995). Sequentemente surgiram estudos utilizando essa cepa para padronizar o X-34 como marcador do peptídeo β-amilóide. Também surgiram outras cepas, como a GMC101, consolidando o modelo para um rastreio farmacológico contra a agregação amiloide

A utilização do *C. elegans* para avaliar os efeitos de uma única exposição precoce ao Fe no primeiro estágio larval do verme torna-se uma ferramenta de grande importância para elucidar se uma exposição ambiental a diferentes concentrações Fe pode levar à indução da agregação amiloide.

3. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que pacientes que desenvolvem a DA possuem uma maior concentração de ferro no cérebro,. Para melhor compreender este fenômeno, utilizamos o nematoide *Caenorhabditis elegans* para avaliar o efeito de uma única exposição no seu primeiro estágio larval a elevadas concentrações de sultafo ferroso (II) em cepas transgênicas expressando o peptídeo β-amilóide no músculo do verme. Hipotetizamos que a exposição a curto prazo, no início da vida dos mutantes, irá acelerar a agregação do peptídeo β-amilóide, causando maior estresse oxidativo, paralisia e redução no tempo de vida dos animais.

4. OBJETIVOS

4.1 **Objetivos gerais**

- Avaliar o efeito de uma única exposição ao sulfato ferro (II) durante o primeiro estágio larval no fenótipo de paralisia e na agregação amiloide, utilizando cepas transgênicas do *Caenorhabditis elegans* que expressam o peptídeo β-amilóide nos músculos.

4.2 **Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da exposição ao sulfato no fenótipo de paralisia e na agregação do beta-amilóide;
- Investigar os efeitos de uma única exposição ao sulfato de ferro (II) em parâmetros toxicológicos, como a sobrevivência, longevidade, parâmetros natatórios (distância percorrida e velocidade média);
- Avaliar o estresse oxidativo após uma única a exposição no primeiro estágio larval ao sulfato de ferro (II) nos animais transgênicos e tipo selvagem;

5. MANUSCRITO

INTERACTION BETWEEN IRON (II) EXPOSURE AND A MODEL OF HUMAN BETA AMYLOID AGGREGATION IN *Caenorhabditis elegans.*

Nariani Saraiva[1]; Marcell Valandro Soares[1,2]; Luiz Eduardo Pilissão; Helder Dias[1]; Daiana Avila[1,2]

[1] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Grupo de pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em Caenorhabditis elegans (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, 97500-970, Brasil.

[2] Laboratório de Neurotoxicologia e Neuroproteção Experimental ($LaNe_2Ex$), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

Iron (Fe) is an essential metal required for mitochondrial respiration, oxygen transport, xenobiotics metabolism and myelin synthesis, just to name a few. However, studies suggest that a deregulation of Fe homeostasis increases its accumulation in the brain and can accelerate the development of Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's disease. In order to gain additional knowledge about this gene x environment interaction, we have used transgenic *Caenorhabditis elegans* strains that express human amyloid β in their body muscles, inducing a paralysis phenotype that is also observed in mammals, and exposed them to Iron (II) sulfate. Bristol N2 (wildtype), GMC 101 (P*unc-54*::A-beta::*unc-54* 3Prime UTR; P*mtl2*::GFP) and CL2006 (P*unc-54*::human A-beta 3-42; pRF4 (*rol-6*(su1006)) worms at the first larval stage were exposed to the 0.5, 1, 2 and 3mM Fe_2SO_4 for 30 minutes. After exposure, we observed that the highest concentrations caused increased mortality rate to the worms of all strains. CL2006 worms presented higher paralysis rate when exposed to 3mM. These worms also performed worse in the swimming assay when exposed to Fe_2SO_4. Notably, both Aβ- expressing strains presented shorter longevity when exposed to Fe_2SO_4 in relation to wildtype. In all strains, Fe overload caused increased reactive species production. Our data indicate that exposure to Fe^{2+} probably do not accelerates the aggregation of human amyloid β *in vivo*, despite increasing paralysis, accelerating aging and impairing worms locomotion, a phenomena that can also occur in humans and accelerate the progression of the disease.

Keywords: Neurodegeneration, aggregation, neurotoxicology, metals.

1.INTRODUCTION

Metals are classified as essential and non-essential, being the essentials required for the homeostasis of living organisms. Fe is one of these essential metals and under normal conditions is involved in important processes for life maintenance such as oxygen transport, mitochondrial respiration, myelin synthesis, synthesis and metabolism of neurotransmitters (Greenough, Camakaris e Bush, 2013). It has an essential role in mitochondrial function and energy production since it promotes the flow of electrons via complexes, being an abundant metal in the brain, due to the metabolic needs (Daglas e Adlard, 2018a). On the other hand, exposure to high levels of this metal has been associated with neurodegeneration, due to its ability to react with hydrogen peroxide by the Fenton reaction, leading to the formation of reactive species that can damage macromolecules (Anderson e Leibold, 2014b). As a consequence, the oxidative stress can lead to neurodegeneration, because of its ubiquitous presence in the encephala (Soares, Fagundez e Avila, 2017).

Notably, some neurodegenerative diseases such as Huntington's, Parkinson's and Alzheimer's (AD) are characterized by increased Fe levels in specific regions of the brain (Batista-Nascimento *et al.*, 2012; Belaidi e Bush, 2016a). Studies reported that an increase of Fe in the brain is related to aging, and this increase could be involved with AD (Quintana *et al.*, 2006). However, it is uncertain whether this accumulation occurs because of ß-amyloid aggregation or whether free Fe induces the formation of the aggregates.

AD is a neurodegenerative disease, classified as the most common form of dementia. It has a slow progression, being characterized by the death of neural cells mainly in the cortical region and hippocampus, regions responsible for cognitive-intellectual functioning (Belaidi e Bush, 2016a). Its main pathological causes are: aggregation of the ß-amyloid peptide (Aß), the main constituent of senile plaques (PS) and the hyperphosphorylation of tau protein, responsible for the intracellular formation of neurofibrillary tangles, which are the hallmarks of this disease (Martorell *et al.*, 2017). This disease mainly affects the elderly and due to the aging of the population has become an epidemic (Mangialasche *et al.*,

2010). An interesting finding is that Fe levels are increased in the aging brain, which could be associated with triggering AD (Wessling-Resnick, 2017). In addition, early-life Fe overload caused by Fe supplementation in infant formula and during episodes of anemia may contribute to the dysregulation of Fe homeostasis. In a study relating children who ingested Fe fortified formula, infants had lower cognitive and visual-motor scores at 10 years than those receiving low-iron formula (Lozoff *et al.*, 2012). Murine pups daily fed with carbonyl Fe (days 10-17 postnatal) for 2 months presented higher concentrations of Fe in the *substantia nigra* (Kaur *et al.*, 2007), suggesting its accumulation. The author hypothesizes that supplementation with Fe in iron-sufficient infants may have adverse effects on neurodevelopment. Another study with rodents suggests that neonatal systemic Fe exposure causes permanent changes to Fe homeostasis in the brain, altering expression of proteins involved in the Fe homeostasis, leading to adverse neurological effects (Dornelles *et al.*, 2010; Fredriksson *et al.*, 1999; Hare *et al.*, 2015; Piñero *et al.*, 2000). As this relationship is still not well elucidated, two hypothetical mechanisms are considered: the first would be the direct binding of Fe to amyloidogenic proteins; and the second, that the generation of free radicals by the Fenton reaction would promote the aggregation of the Aß peptide (Joppe *et al.*, 2019).

In order to better study this gene x environment interaction, and at the same time to reduce the number of animals for experimentation, the use of the invertebrate model *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) has been widely explored as an *in vivo* model for Aß aggregation. This nematode has its genome completely elucidated and shares many genetic and metabolic similarities to mammals. About 40% of genes that are related to human diseases have orthologues in *C. elegans,* which is not the case of Aß and tau. In this case, because of its easy genetic manipulation, the generation of humanized mutants expressing human Aß and tau protein that aggregate allows the study of AD (Corsi, Wightman e Chalfie, 2015). In this context, Klang et al., (2014) demonstrated that the aging of nematode *C. elegans* is also associated with the accumulation of Fe and an increase in insoluble proteins (Klang *et al.*, 2014).

Our group has already demonstrated in *C. elegans* that a short exposure to $FeSO_4$ (II) causes multiple biological defects, as alterations in longevity and

locomotion, in addition to causing dopaminergic neurodegeneration and oxidative stress, which can contribute to accelerating AD development (Almeida Fagundez, De *et al.*, 2015; Soares, Puntel e Ávila, 2018). In this context, we sought to evaluate the effects of early Fe exposure on the paralysis caused by peptide Aβ aggregation in *C. elegans*. We hypothesized that a short-term early-life Fe overload will increase muscle aggregation of the peptide, leading to an increase in the rate of paralysis and altering locomotion parameters in the experimental *C. elegans* Aβ model.

2.METHODOLOGY

2.1 Preparation of treatment solutions

For the preparation of the treatment solutions, a stock solution (SS) of 60mM of iron (II) sulfate heptahydrated ($FeSO_4.7H2O$) was prepared in saline solution (0.5% NaCl). The final concentrations used in the tests were 0.5, 1, 2 and 3 mM, which were based on previous studies from our group.

2.2 Strains and *Caenorhabditis elegans* maintenance

The strains used during the study were N2 (wild type), GMC101 (P*unc-54*::A-beta(1-42)::*unc-54* 3Prime UTR; P*mtl2*::GFP) and CL2006 (P*unc-54*::human A-beta 3-42; pRF4 (*rol-6*(su1006)). All strains were obtained from the Caenorhabditis Genetic Center (CGC, Minnesota, USA). During this study, the nematodes were maintained on plates with nematode growth media (NGM) medium seeded with *Escherichia coli* OP50.

Both model strains for the aggregation of β-amyloid peptide are induced after increasing the maintenance temperature The GMC101 strain is kept in an incubator at 20ºC for the proper development of animals and when exposed to a temperature of 25°C, expresses the Aβ peptide present in the body wall muscles and they paralyze. CL2006 strain is maintained at 15ºC and when exposed to 20ºC also expresses and aggregates the Aβ in the body wall muscles. Because of these different temperature exposures, wildtype worms were exposed to the same conditions and, therefore, we have two different strain controls. Notably, CL2006 has a roller phenotype.

2.3 Synchronization

To obtain the worms in their L1 stage, pregnant adult worms were submitted to a synchronization process. This process consists of using a lysis solution containing sodium hypochlorite (NaClO, 2%) and sodium hydroxide (NaOH, 10 M), so the cuticle of the pregnant worms can be broken and eggs can be obtained. 14 hours later the L1 larvae hatched from the eggs, which were later used for treatments.

2.4 Survival, longevity and paralysis rate assays

L1 larvae of strains N2, GMC101 and CL2006 were exposed to different concentrations of $FeSO_4$ in liquid medium for 30 minutes and, soon after, washed for three times to remove the treatments. Afterwards, they were placed on plates

containing NGM medium and *E. coli* OP50 for 48 hours at 20ºC. 48h after the end of the treatment, the survival rate of the worms was analyzed, comparing treated groups with the control group (4-5 independent experiment were performed).

For longevity assay, 48h after the end of the of treatment 25 worms from each group of N2 and GMC101 were transferred to new plates with *E. coli* OP50 and exposed to 25ºC for 96h in order to induce the expression of the Aβ peptide. After 96h, the worms were again kept at 20ºC, transferred to new plates, until all worms were dead. All worms that did not respond to touch stimuli were considered dead. The same process was done for CL2006 and N2, but both strains were kept at 20°C throughout the whole assay (at least three independent experiment were performed).

Parallel to the longevity assay, using the same 25 worms, the paralysis rate was performed with the strains N2,GMC101 and Cl2006 . Paralysis was verified 48h, 72h and 96h after upshift to 25ºC or 20 ºC, being considered paralyzed the worms that received the touch stimulus and did not move the middle of the body, or only moved the head and tail. At least three independent experiments were performed.

2.5 Swimming assay

The swimming test was performed in order to assess locomotion movements, speed and distance travelled in the liquid by N2 and GMC101 strain (CL2006 was not used because of its roller phenotype). After 48h of treatment, fifteen worms from each group were transferred to a new plate containing *E.coli* and exposed to 25ºC for 24h. The 24h time was chosen for longer at 25 degrees the animals were physiologically very debilitated. After that, five worms were transferred to a 24-well plate containing 200µL of saline (0.9% NaCl) in each well. For 30s, the worms were acclimated and then recorded for 1 minute, using the Olympus SZ2-LGB stereo micorscope a smartphone adapter and a smartphone to record the videos. The *Tracker video analysis and modeling tool software* from ImageJ was then used to track the locomotion of each worm. Average speed,

swimming movements and swimming distance were measured for each group of 5 animals. At least three independent experiments were performed.

2.6 ROS

To determine ROS production following treatments, 5000 worms were exposed as previously described for 30 minutes and then analyzed 48h to N2 and 72h to CL2006 after exposure (due to delay in the development). Worms were washed from the plates and were transferred to microtubes containing 500 µM of carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-DCFDA) for 1 hour in the dark. After that, the worms were washed to remove the excessive dye and then transferred to microplates and the fluorescence was quantified in a microplate reader (SpectraMax M5/Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The fluorescence levels (excitation: 485 nm; emission: 525nm) of the samples were detected at 20 °C. The fluorescence from each well was measured every 15min for up to 60min. The delta of the fluorescence readings (t60-t0) was expressed as a percentage of the control. The measurements were repeated three times and each condition was performed in duplicates, normalized by protein.

After these same assay protocol, 5 worms per group were photographed for representative images to measure their fluorescence and corroborate to the readings.

2.7 Thioflavin-S staining

Labeling of amyloid aggregates was performed as described in (Zhang *et al.*, 2022) with some modifications, using the strain CL2006. 48h after treatment the worms were collected from the plates, washed three times with saline and then fixed with 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS: 137mM NaCl, 10mM phosphate, 2.7mM KCl; pH 7.4) at 4 ºC. The worms were then permeabilized in buffer containing 1 % Triton X-100, 5 % fresh β-mercaptoethanol, 125 mM Tris, pH 7.4, in a 4 ºC incubator for 24 h. The worms were stained with 0.125 % Thioflavin S (dissolved in 50 % ethanol) for 20 min.

Slides were observe in cellular microscope and images acquired. The amyloid aggregates of 10 worms were counted. At least three independent experiments were performed

2.8 Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SEM. Shapiro-Wilk test was conducted to verify data normality. Parametric data were submitted to one-way followed by Tukey or Bonferroni post-test. Non-parametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test assuming the significance level when the p value is <0.05.

3.RESULTS

The wild type strain and the mutant strains that aggregate the Aβ in the body wall muscles did not demonstrate a difference in survival rate when compared among them. Notably, the strains showed a similar response to different concentrations of Fe exposure. The exposure to the concentration of 3mM of Fe was able to decrease significantly the survival of the three different strains (Figure 1; Table 1).

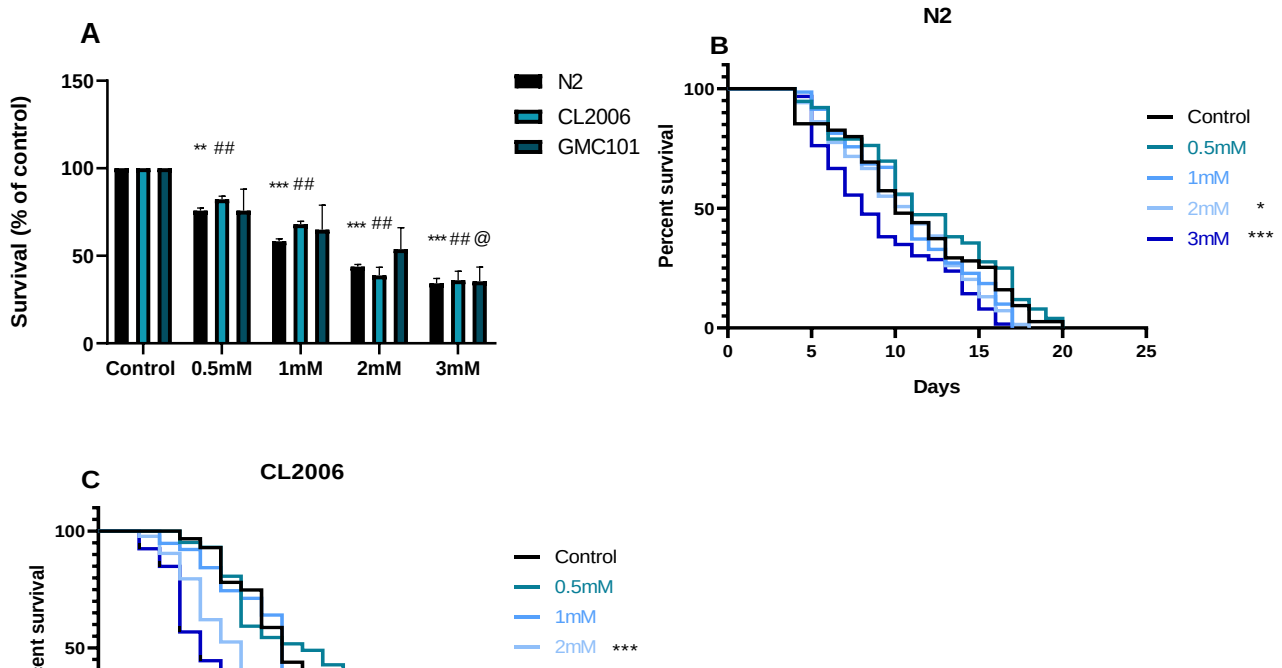


Figure 1. Mortality and lifespan after exposure to Fe^{2+}, in wildtype and in the different strains expressing the β-amyloid peptide in the body wall muscles. (A) Treatment with Fe at all concentrations significantly decreased the survival rate of the N2 strain ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ of significance in compared to its respective control. The strain CL2006 also had decreased survival at all exposed concentrations ## $p<0.01$. In relation to the GMC101 strain, only the treatment with Fe at 3mM decreased the survival of the worms @ $p<0.05$ and ## $p<0.01$ of significance by one-way ANOVA followed by Tukey post-test. (n=3-5). (B-C) Lifespan of the wild type strain N2 and longevity of the CL2006 strain at 20º. $p<0.5$ *; $p<0.01$ **; $p<0.001$*** of significance by one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. (At least three independent experiments were performed in every assay).

Table 1: Average survival of the exposed worms (in days)

N2	Control	0.5mM	1mM	2mM	3mM
Median survival	10	11	11	11	8

CL2006	Control	0.5mM	1mM	2mM	3mM
Median survival	9	10	9	7	5

Fe exposure did not cause a significant increase in the paralysis in the strain GMC101 at the different days (S1). However, in the CL2006 strain, it was possible to observe a dose-dependent response in the first 48h of the test. As we can observe in the Figure 2A, at 1mM the paralysis was significantly different from the control, gradually increasing up to 3 mM. Nevertheless, this effect did not persist for the next 24h and the dose-dependent response was lost. Figure 2B depicts that only the Fe concentration of 3mM caused a significant difference from the control. At 96h, this response was lost and all groups paralyzed equally (Figure 2C).

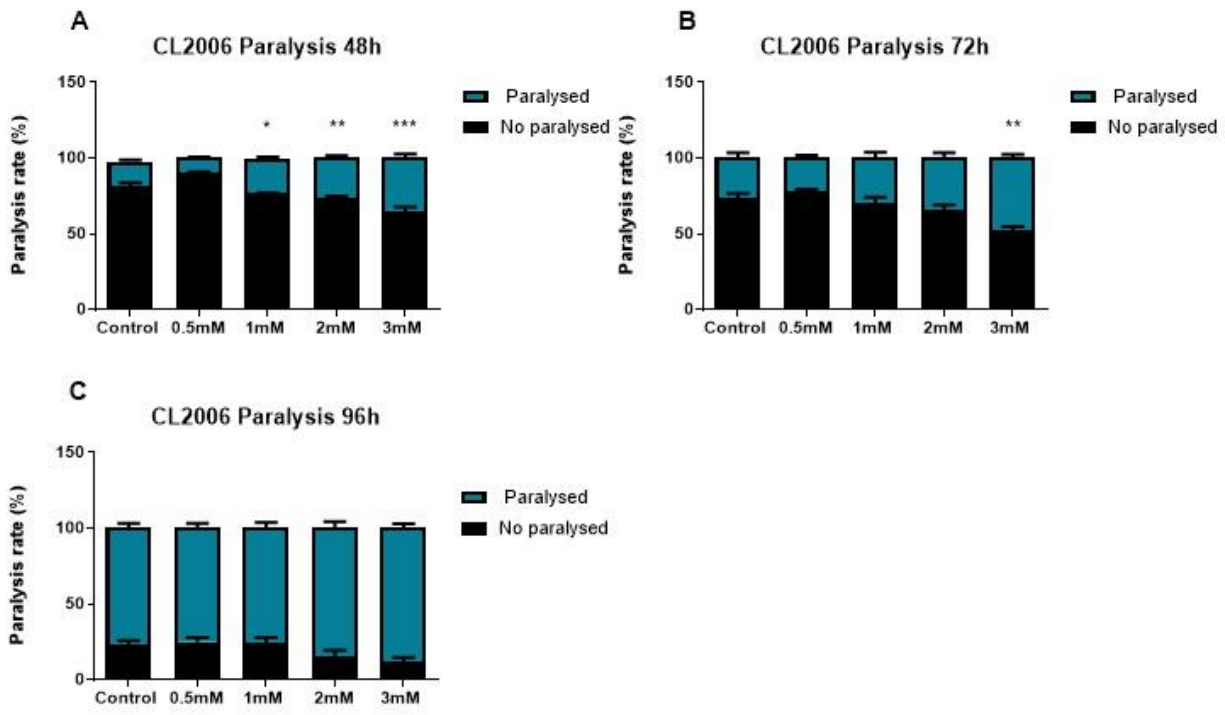


Figure 2. Evaluation of the paralysis rate at 48h, 72h and 96h after exposure to Fe^{2+}. Rate of paralysis of the CL2006 strain at 20 ºC after 48H (A), 72H (B) and 96h (C). One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. (At least three independent experiments were performed). *P< 0.05; **P< 0.01 and ***P<0.001 means paralyzed different from the paralyzed control.

For the swimming assay we used the GMC101 strain because the CL2006 has a roller phenotype and does not have the natural swimming movement. As hypothesized, the number of swimming, mean velocity and the swimming distance were significantly decreased by Fe exposure. The concentration of 3mM was able to decrease the mean velocity of locomotion and the swimming distance (Figure 3A), whereas at 1mM and 3mM Fe was able to reduce the swimming distance (Figure 3B). We can also observe this decrease in locomotion at the concentrations 1mM and 3mM at the representative images (Figure 3C).

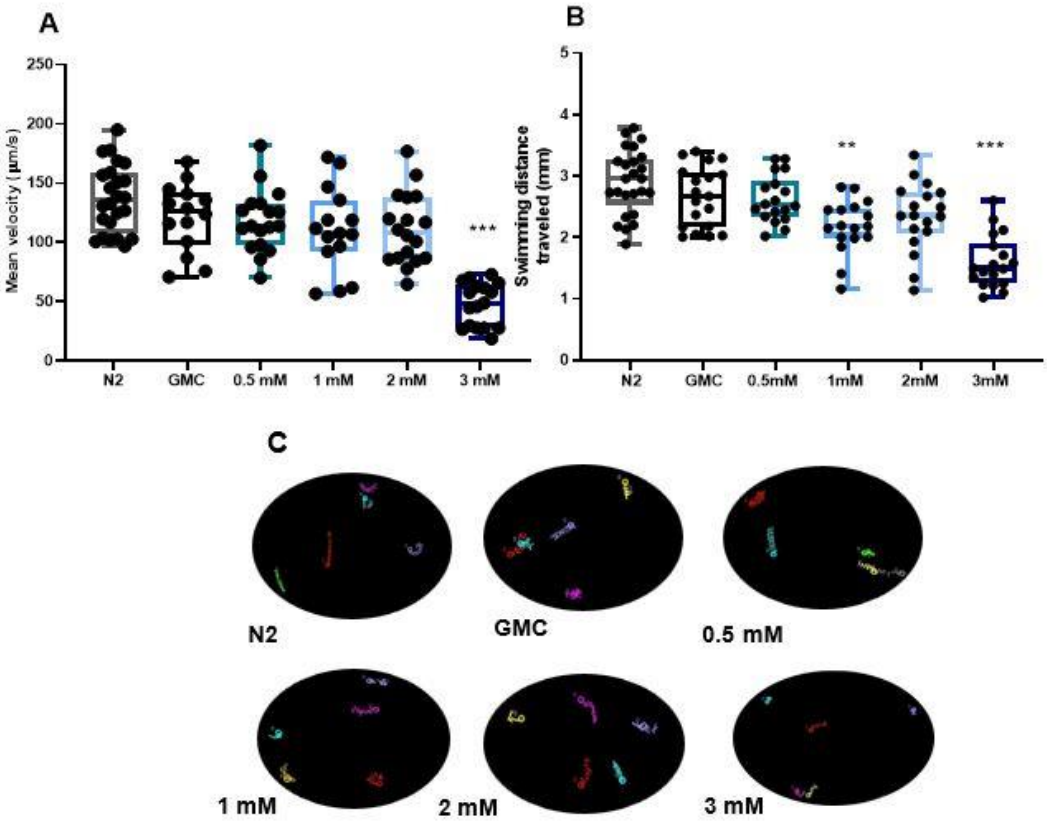


Figure 3. Test of locomotion with GMC101 strain after exposure to Fe^{2+}. Mean velocity of worms, 24h after exposure at 25ºC (A), in (B) distance traveled and in (C) representative image of the isolated trajectories of the video analysis and modeling tool software, referring to the distance traveled by the worms in liquid medium. Significance was determined using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post hoc test. Symbols show significant differences in relation to the GMC control group: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

To determine ROS levels assay, we used the CL2006 strain, considering that the GMC101 animals have the *mtl-2* expressed in the intestine tagged with GFP. In the wild type and CL2006 strain the levels of ROS were significantly different from the control at 1mM to 3mM (Figure 4).

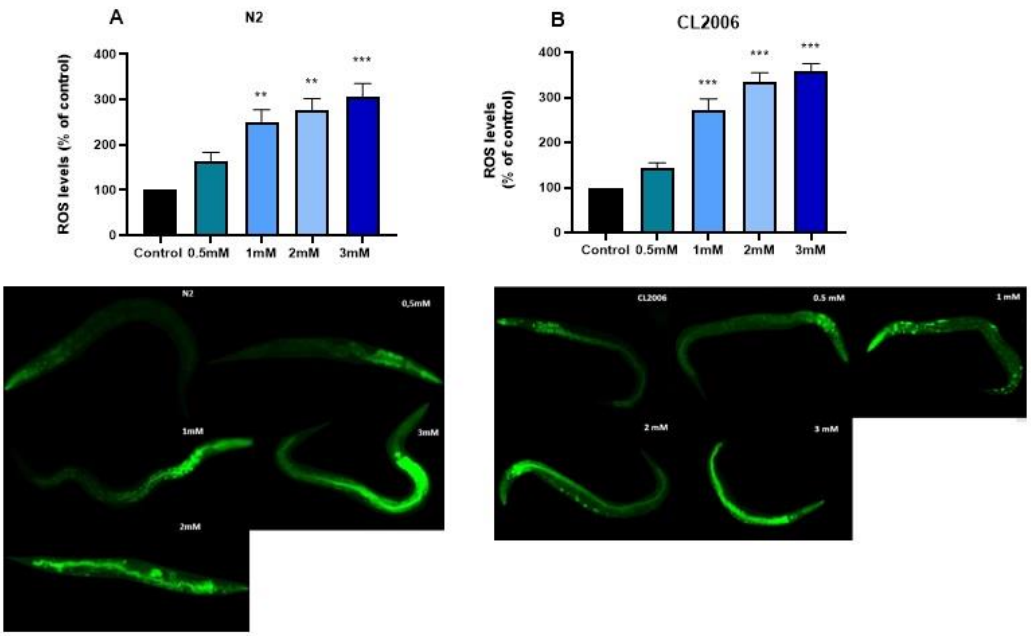


Figure 4. Oxidative species from the wild type and CL2006 strains at the different concentrations after exposure to Fe. Delta of the fluorescence readings (t60-t0). (A) Wild type and its respective representative imagens. (B) CL2006 and its respective representative imagens. Significance was determined using One way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Symbols show significant differences in relation to the control group: *<0.05; ** p <0.01 and *** p <0.001.

The number of aggregates was also measured (Figure 5). However, 48h after exposure, it was not possible to verify any significant difference between the groups. These results suggest that Fe may not induce amyloid aggregation, but may induce neuroinflammation and increase the paralysis phenotype.

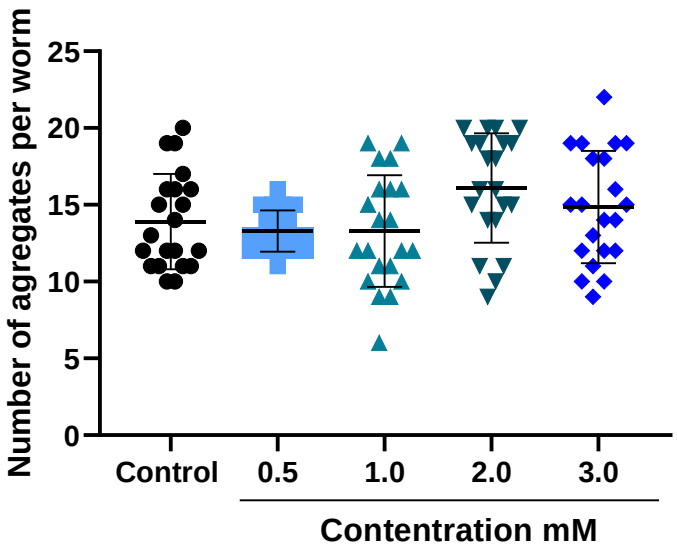


Figure 5. Number of aggregates per worm. Significance was determined using Kruskal-Wallis test. No statistical difference was observed.

4.DISCUSSION

AD has been considered a multifactorial disease associated with several risk factors and so far, more than twenty factors have been already identified. Some of them are aging, diet, genetic factors, mitochondrial function, air pollution, vascular diseases, infections and environmental factors, among others (Armstrong, 2019; Breijyeh e Karaman, 2020b). As aging and genetic predisposition cannot explain all cases of AD, risk factors related to environmental exposure, such as metals, have been considered a major contributor to the development of this disease, due to their ability to cause oxidative stress leading to a neuroinflammatory and neurodegenerative processes (Armstrong, 2019; Batista-Nascimento *et al.*, 2012; Farina *et al.*, 2013). Another important factor that must be taken into account regarding metal poisoning is an imbalance in the internal homeostasis of the essential metals that occurs with aging and may result in the AD pathology (Armstrong, 2019; Batista-Nascimento *et al.*, 2012). Considering that Fe is involved in the regulation of the amyloid precursor protein (APP), tau and apolipoprotein E, that has been

associated with the βA aggregation (Armstrong, 2019; Batista-Nascimento *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2018), investigating early life Fe overload effect associated to a genetic predisposition is of interest. In this sense, in our study we have found that exposure to high Fe concentrations for 30 minutes at L1 stage decreased the survival of all strains, increasing locomotor damage in the transgenic strain GMC101. In the wild type and CL2006 transgenic strains, the exposure caused a decrease in the lifespan, accelerating aging and increasing the paralysis rate in the CL2006 strain. In addition, it increased the ROS production in both strains.

The exposure to Fe decreased the survival rate of different humanized strains for AD and the wild type in the present study. As observed in other investigations from our lab, Fe is toxic for the *C. elegans* at different concentrations. Fagundez, Camara et al. (2015) found a LC_{50} of 1.2mM for the wild type strain at the same conditions tested in this study. Soares et al. (2018) also observed a significant decrease in the survival of the wild type strain when worms were exposed to concentrations of 0.5, 1mM and 2mM of Fe during 30 minutes. Considering these previous studies, we have chosen the concentration range for our study. We observed that the model strains for muscle Aβ peptide aggregation have a similar sensibility to the Fe exposure, as depicted in Figure 1A.

In the present study it was possible to observe that 48h after the end of Fe exposure, the paralysis rate increased in a concentration-dependent manner in the strain CL2006 (Figure 2). However, the exposure to Fe did not cause a significant difference in the paralysis of the GMC101 strain (S1), but was able to cause significant changes in swimming parameters (Figure 3). We believe that the paralysis was accelerated by Fe overload due to its ability to promote the aggregation of the Aß peptide and the tau protein, as described in *in vitro* and *in vivo* studies as well (Mantyh *et al.*, 1993; Sayre *et al.*, 2000).

As demonstrated for Klang et al. (2014) an exposure to a much higher concentration of 15mM of ferric ammonium citrate, which is an Fe (III) form, increased the paralysis at 120h after exposure in the strain CL4176, which expresses the $A\beta_{1-42}$ in the body-wall muscles. This study also demonstrated that the amount of Fe in *C. elegans* increases with aging, just like occurs in humans (Klang *et al.*, 2014). The same study observed that when the worms were treated

with CaEDTA (a metal chelator) at the first day of adulthood it reduced the Fe levels with aging and decreased the paralyses rate. Metal chelation therapy is a potential clinical strategy for the treatment of AD, as deferrioxamine, a specific Fe chelator, has been found to significantly slow the progression of AD in one clinical trial and also in *in vitro* studies, demonstrating its ability to decrease the aggregation of senile plaques and neurofibrillary tangles. (McLAchlan et al., Sayre et al. 2000). In another clinic study with 48 patients, McLachlan et al. (1991) demonstrated that deferoxamine intramuscularly twice dayli in patients with AD had a significant reduction in the rate of decline of the intelligence and memory. Zhang et al. (2017) demonstrated that the treatment with deferoxamine in APP/PS Doble mutant mice was able to reduce the cognitive Aβ peptide aggregation, ameliorate cognitive function and inhibited apoptosis in the brain.

Regarding the modifications in the number of swimming movements, this finding could be associated to the Aβ peptide aggregation as well. This aggregation causes a limitation in the muscle and as consequence alters the swimming movement. Another explanation for altering these systems would be the neuronal damage caused by Fe exposure (Rand, 2007; Zhen e Samuel, 2015), as dopaminergic neurons that stimulate movement for food search in starved animals (Almeida Fagundez, De *et al.*, 2015; Soares, Puntel e Ávila, 2018). In this way, we analyzed the acetylcholinesterase activity to verify the integrity of the cholinergic system (Data not shown). However, no significant difference was found. Nonetheless, we do not rule out the possibility of cholinergic damage, considering that synaptic damage or altered amounts of acetylcholine can be occurring.

We have observed a decreased lifespan in wild type and in CL2006 worms (Figures 1 C), suggesting that an exposure to high concentrations of Fe is able to accelerate the aging of the worm. Notably, we have detected increased reactive oxygen species in worms exposed to Fe in both wild type and CL2006 strains 48h and 72h after exposure, respectively (Figure 4). Fe can trigger the formation of reactive oxygen species, since Fe^{2+} can react with H_2O_2 generating the highly reactive hydroxyl free radical (•OH) by the Fenton Reaction: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$ (Batista-Nascimento *et al.*, 2012). However, there was no change in the number of amyloid aggregates, which may be because at this

stage, Fe possibly contributes to neuroinflammation and therefore increasing paralysis phenotype (Figure 5). Associating these results, we could suggest that the exposure to excessive Fe concentrations can led to ferroptosis, a cell death type that is Fe dependent and one of its main hallmarks is ROS formation and lipid peroxidation (Dixon *et al.*, 2012; Stockwell *et al.*, 2017). Therefore, we believe that in our protocol we may be inducing ferroptotic cell death via free radical formation by the Fenton reaction, causing subsequent oxidation of biomolecules, as lipid membrane, accelerating neuronal degeneration and aging. Notably, recent literature suggests that ferroptosis has been associated with neurodegenerative diseases, including AD (Hambright *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

Fe overload can occur due to excessive dietary supplementation, contaminated food and water, occupational exposure or by genetic diseases such as hemochromatosis and neuroferritinopathies (Salvador, Uranga e Giusto, 2011). Considering that Fe can deposit in the neurons and trigger ferroptosis, people that have a genetic predisposition to AD can be at higher risk of an early-onset and even presenting lower response to the treatments that could reduce the symptoms and prolong patient’s lifespan.

Considering all these results, we can suggest that the exposure to high concentrations of Fe in early-life can induce the paralysis phenotype, without causing a change in the number of amyloid aggregates, possibly contributing to neuroinflammation, accelerating aging and locomotor impairment in AD-humanized model in *C. elegans*. In addition, Fe overload can accelerate the aging through the Fe capacity to cause the production of ROS and lead to ferroptosis.

5. REFERENCES

ALEXANDER, A. G.; MARFIL, V.; LI, C. Use of Caenorhabditis elegans as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Frontiers in genetics**, v. 5, n. JUL, 2014.

ALMEIDA FAGUNDEZ, D. DE *et al.* Behavioral and dopaminergic damage induced by acute iron toxicity in Caenorhabditis elegans. **Toxicology Research**, v. 4, n. 4, p. 878–884, 1 jul. 2015.

ANDERSON, C. P. *et al.* Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 9, p. 1468–1483, set. 2012.

ANDERSON, C. P.; LEIBOLD, E. A. Mechanisms of iron metabolism in Caenorhabditis elegans. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, 2014a.

___. Mechanisms of iron metabolism in caenorhabditis elegans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, p. 113, 2014b.

ARMSTRONG, R. A. Risk factors for Alzheimer's disease. **Folia neuropathologica**, v. 57, n. 2, p. 87–105, 2019.

AVILA, J. *et al.* Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. **Physiological reviews**, v. 84, n. 2, p. 361–384, abr. 2004.

AYTON, S. *et al.* Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. **Nature communications**, v. 6, 19 maio 2015.

___. Regional brain iron associated with deterioration in Alzheimer's disease: A large cohort study and theoretical significance. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 17, n. 7, p. 1244–1256, 1 jul. 2021.

AYTON, S.; DIOUF, I.; BUSH, A. I. Evidence that iron accelerates Alzheimer's pathology: a CSF biomarker study. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 89, n. 5, p. 456–460, 1 maio 2018.

AYTON, S.; JAMES, S. A.; BUSH, A. I. Nanoscale Imaging Reveals Big Role for Iron in Alzheimer's Disease. **Cell chemical biology**, v. 24, n. 10, p. 1192–1194, 19 out. 2017.

BATISTA-NASCIMENTO, L. *et al.* Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

BECERRIL-ORTEGA, J. *et al.* Iron overload accelerates neuronal amyloid-β production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 10, p. 2288–2301, 2014.

BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of neurochemistry**, v. 139 Suppl, p. 179–197, out. 2016a.

___. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of neurochemistry**, v. 139 Suppl 1, p. 179–197, 1 out. 2016b.

BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, 1 dez. 2020a.

___. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, 8 dez. 2020b.

BUTLER, L. G. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. **Basic life sciences**, v. 59, p. 693–698, 1992.

CALDWELL, K. A.; WILLICOTT, C. W.; CALDWELL, G. A. Modeling neurodegeneration in Caenorhabditiselegans. **Disease models & mechanisms**, v. 13, n. 10, 1 out. 2020.

CHEN, L. L. *et al.* The metal ion hypothesis of Alzheimer's disease and the anti-neuroinflammatory effect of metal chelators. **Bioorganic chemistry**, v. 131, 1 fev. 2023.

CHEN, M. *et al.* High Dietary Iron Disrupts Iron Homeostasis and Induces Amyloid-β and Phospho-τ Expression in the Hippocampus of Adult Wild-Type and APP/PS1 Transgenic Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 149, n. 12, p. 2247–2254, 1 dez. 2019.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 2015.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role for Caenorhabditis elegans in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 6, p. 869–877, 12 abr. 2000.

DAGLAS, M.; ADLARD, P. A. The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 981, dez. 2018a.

___. The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, 20 dez. 2018b.

DAWKINS, E.; SMALL, D. H. Insights into the physiological function of the β-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 129, n. 5, p. 756–769, 2014.

DIXON, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 25 maio 2012.

DORNELLES, A. S. *et al.* mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period. **Neurochemical research**, v. 35, n. 4, p. 564–571, abr. 2010.

DU, L. *et al.* Increased Iron Deposition on Brain Quantitative Susceptibility Mapping Correlates with Decreased Cognitive Function in Alzheimer's Disease. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1849–1857, 18 jul. 2018.

E, TÖNNIES; E, TRUSHINA. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.

EARLEY, B. J. *et al.* Zinc homeostasis and signaling in the roundworm C. elegans. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1868, n. 1, 1 jan. 2021.

FARINA, M. *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 575–594, 2013.

FREDRIKSSON, A. *et al.* Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 25–30, 15 ago. 1999.

GALE, S. A.; ACAR, D.; DAFFNER, K. R. Dementia. **The American journal of medicine**, v. 131, n. 10, p. 1161–1169, 1 out. 2018.

GOEDERT, M. *et al.* PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode Caenorhabditis elegans. **Journal of cell science**, v. 109 (Pt 11), n. 11, p. 2661–2672, nov. 1996.

GREENOUGH, M. A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A. I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 540–555, abr. 2013.

GRIFFIN, E. F.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A. **Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using Caenorhabditis elegansACS Chemical Neuroscience**American Chemical Society, , 20 dez. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29022701/>. Acesso em: 9 jun. 2021

HAGEMEIER, J.; GEURTS, J. J. G.; ZIVADINOV, R. Brain iron accumulation in aging and neurodegenerative disorders. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 12, n. 12, p. 1467–1480, dez. 2012.

HALLGREN, B.; SOURANDER, P. The non-haemin iron in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 5, n. 4, p. 307–310, 1960.

HAMBRIGHT, W. S. *et al.* Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. **Redox biology**, v. 12, p. 8–17, 1 ago. 2017.

HARE, D. J. *et al.* Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? **Nature reviews. Neurology**, v. 11, n. 9, p. 536–544, 7 set. 2015.

HORNSTEN, A. *et al.* APL-1, a Caenorhabditis elegans protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 6, p. 1971–1976, 6 fev. 2007.

JAMES, S. A. *et al.* Iron, Copper, and Zinc Concentration in Aβ Plaques in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Correlates with Metal Levels in the Surrounding Neuropil. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 629–637,

15 mar. 2017.

JIANG, H. *et al.* Brain Iron Metabolism Dysfunction in Parkinson's Disease. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 3078–3101, 1 maio 2017.

JOPPE, K. *et al.* The contribution of iron to protein aggregation disorders in the central nervous system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JAN, p. 15, 2019.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–399, abr. 2006.

KAUR, D. *et al.* Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. **Neurobiology of aging**, v. 28, n. 6, p. 907–913, jun. 2007.

KLANG, I. M. *et al.* Iron promotes protein insolubility and aging in C. elegans. **Aging (Albany NY)**, v. 6, n. 11, p. 975, 2014.

KOPPENOL, W. H.; HIDER, R. H. Iron and redox cycling. Do's and don'ts. **Free radical biology & medicine**, v. 133, p. 3–10, 1 mar. 2019.

LI, L. *et al.* The association between apolipoprotein E and gallstone disease: an updated meta-analysis. **BMC medical genetics**, v. 20, n. 1, 14 jun. 2019.

LINK, C. D. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic Caenorhabditis elegans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9368–9372, 26 set. 1995.

LOZOFF, B. *et al.* Iron-fortified vs low-iron infant formula: developmental outcome at 10 years. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 166, n. 3, p. 208–215, mar. 2012.

LU, C. *et al.* Toxicity interactions between manganese (Mn) and lead (Pb) or cadmium (Cd) in a model organism the nematode C. elegans. **Environmental science and pollution research international**, v. 25, n. 16, p. 15378–15389, 1 jun. 2018.

MANGIALASCHE, F. *et al.* Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. **The Lancet. Neurology**, v. 9, n. 7, p. 702–716, jul. 2010.

MANTYH, P. W. *et al.* Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. **Journal of neurochemistry**, v. 61, n. 3, p. 1171–1174, 1993.

MARTINEZ-FINLEY, E. J. *et al.* Insights from Caenorhabditis elegans on the role of metals in neurodegenerative diseases. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 3, n. 3, p. 271–279, mar. 2011.

MARTORELL, P. *et al.* A nutritional supplement containing lactoferrin stimulates the immune system, extends lifespan, and reduces amyloid β peptide toxicity in Caenorhabditis elegans. **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 255, mar. 2017.

MCCARTHY, R. C. *et al.* Characterization of a novel adult murine immortalized microglial cell line and its activation by amyloid-beta. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, 27 jan. 2016.

___. Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 20, p. 7853–7863, 18 maio 2018.

MCCARTHY, R. C.; PARK, Y.; KOSMAN, D. J. sAPP modulates iron efflux from brain microvascular endothelial cells by stabilizing the ferrous iron exporter ferroportin. **EMBO reports**, v. 15, n. 7, p. 809–815, jul. 2014.

MCCOLL, G. *et al.* Utility of an improved model of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) toxicity in Caenorhabditis elegans for drug screening for Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 7, n. 1, 2012.

MCLACHLAN, D. R. C.; KRUCK, T. P.; *et al.* Would decreased aluminum ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease? **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, v. 145, n. 7, p. 793, 1991.

MCLACHLAN, D. R. C.; KRUCK, T. P. A.; *et al.* Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8753, p. 1304–1308, 1 jun. 1991.

MORCOS, M.; HUTTER, H. The model Caenorhabditis elegans in diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 16, n. 4, p. 897–908, 2009.

NATALE, C.; BARZAGO, M. M.; DIOMEDE, L. Caenorhabditis elegans Models to Investigate the Mechanisms Underlying Tau Toxicity in Tauopathies. **Brain sciences**, v. 10, n. 11, p. 1–17, 1 nov. 2020.

NICOLAI, M. M. *et al.* Manganese-Induced Toxicity in C. elegans: What Can We Learn from the Transcriptome? **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 18, 1 set. 2022.

PAL, A. *et al.* Iron in Alzheimer's Disease: From Physiology to Disease Disabilities. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, 1 set. 2022.

PASRICHA, S. R. *et al.* Iron deficiency. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10270, p. 233–248, 16 jan. 2021.

PENG, Y.; CHANG, X.; LANG, M. Iron Homeostasis Disorder and Alzheimer's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, 1 nov. 2021.

PETERS, D. G.; CONNOR, J. R.; MEADOWCROFT, M. D. The relationship between iron dyshomeostasis and amyloidogenesis in Alzheimer's disease: Two sides of the same coin. **Neurobiology of disease**, v. 81, p. 49–65, 1 set. 2015.

PIÑERO, D. J. *et al.* Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 254–263, 2000.

QUINTANA, C. *et al.* Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. **Journal of structural biology**, v. 153, n. 1, p. 42–54, jan. 2006.

RAND, J. B. Acetylcholine. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–21, 2007.

REVI, M. Alzheimer's Disease Therapeutic Approaches. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1195, p. 105–116, 2020.

SALLOWAY, S. *et al.* Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. **JAMA neurology**, v. 79, n. 1, p. 13–21, 2022.

SALVADOR, G. A.; URANGA, R. M.; GIUSTO, N. M. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2011.

SAYRE, L. M. *et al.* In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 270–279, 2000.

SMIALOWSKA, A.; BAUMEISTER, R. Presenilin function in Caenorhabditis elegans. **Neuro-degenerative diseases**, v. 3, n. 4–5, p. 227–232, out. 2006.

SOARES, F. A.; FAGUNDEZ, D. A.; AVILA, D. S. Neurodegeneration Induced by Metals in Caenorhabditis elegans. *In*: **Advances in Neurobiology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 18p. 355–383.

SOARES, M. V.; PUNTEL, R. L.; ÁVILA, D. S. Resveratrol attenuates iron-induced toxicity in a chronic post-treatment paradigm in Caenorhabditis elegans. **Free radical research**, v. 52, n. 9, p. 939–951, 2 set. 2018.

SPENCE, H.; MCNEIL, C. J.; WAITER, G. D. Cognition and brain iron deposition in whole grey matter regions and hippocampal subfields. **The European journal of neuroscience**, v. 56, n. 11, p. 6039–6054, 1 dez. 2022.

STOCKWELL, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 273–285, 5 out. 2017.

TIWARI, S. *et al.* Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 5541–5554, 2019.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, p. 1105–1121, 2017.

TURNER, B. J.; HOJAT, M.; GONNELLA, J. S. Using ratings of resident competence to evaluate NBME examination passing standards. **Journal of medical education**, v. 62, n. 7, p. 572–581, 1987.

VILLAIN, N.; DUBOIS, B. Alzheimer's Disease Including Focal Presentations. **Seminars in neurology**, v. 39, n. 2, p. 213–226, 2019.

VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. **Acta neuropathologica**, v. 129, n. 2, p. 183–206, 24 jan. 2015.

WALSH, S. *et al.* Aducanumab for Alzheimer's disease? **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 374, 5 jul. 2021.

WANG, C. Y.; BABITT, J. L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 18–29, 3 jan. 2019.

WANG, F. *et al.* Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis: A New Alzheimer's Disease Hypothesis? **Frontiers in aging neuroscience**, v. 14, 22 mar. 2022.

WARD, R. J. *et al.* The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 10, p. 1045–1060, 1 out. 2014.

WESSLING-RESNICK, M. Excess iron: Considerations related to development and early growth. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. Suppl 6, p. 1600S-1605S, dez. 2017.

WESTLUND, B. *et al.* Reverse genetic analysis of Caenorhabditis elegans presenilins reveals redundant but unequal roles for sel-12 and hop-1 in Notch-pathway signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2497–2502, 2 mar. 1999.

WONG, B. X. *et al.* β-Amyloid precursor protein does not possess ferroxidase activity but does stabilize the cell surface ferrous iron exporter ferroportin. **PloS one**, v. 9, n. 12, 2 dez. 2014.

YI, B. *et al.* Small molecule modulator of sigma 2 receptor is neuroprotective and reduces cognitive deficits and neuroinflammation in experimental models of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 140, n. 4, p. 561–575, 1 fev. 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in C. elegans via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. **European journal of pharmacology**, v. 919, 15 mar. 2022.

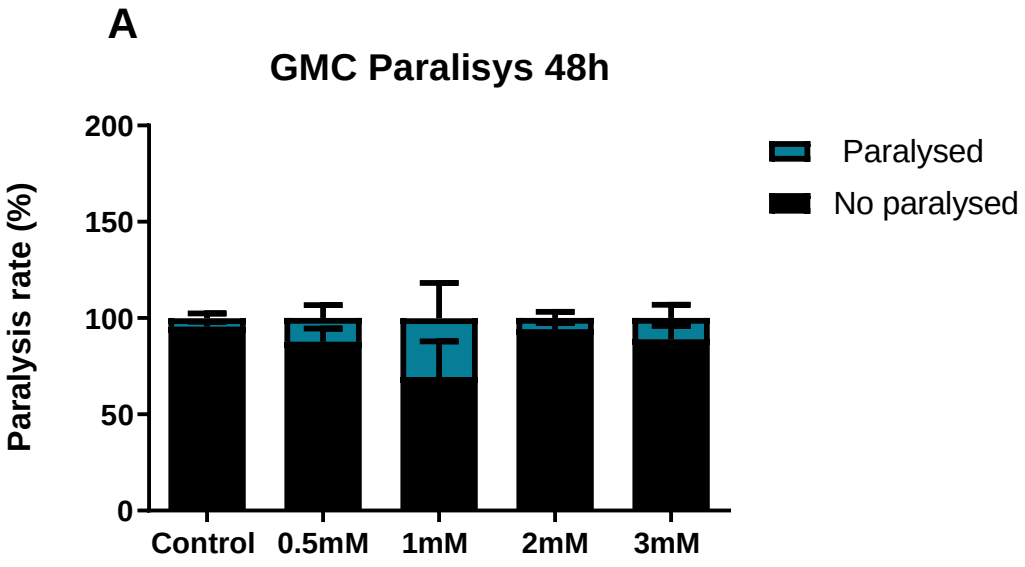
ZHANG, Y.; HE, M. LIN. Deferoxamine enhances alternative activation of microglia and inhibits amyloid beta deposits in APP/PS1 mice. **Brain research**, v. 1677, p. 86–92, 15 dez. 2017.

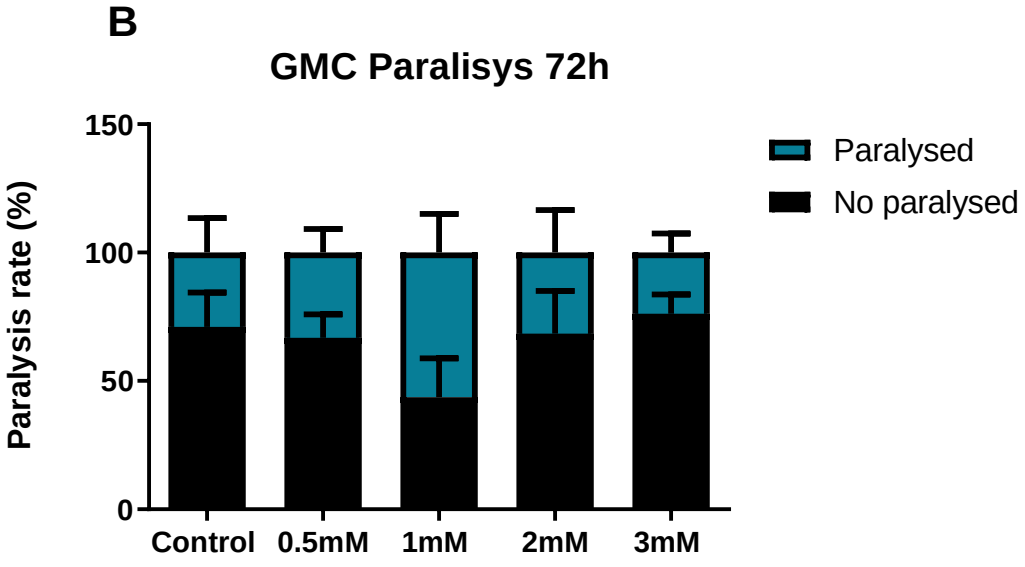
ZHAO, N. *et al.* Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. **Biological psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 347–357, 15 fev. 2018.

ZHEN, M.; SAMUEL, A. D. T. C. elegans locomotion: small circuits, complex functions. **Current opinion in neurobiology**, v. 33, p. 117–126, 1 ago. 2015.

ZHOU, Z. D.; TAN, E. K. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. **Molecular neurodegeneration**, v. 12, n. 1, 23 out. 2017.

SUPLEMENTARY MATERIAL





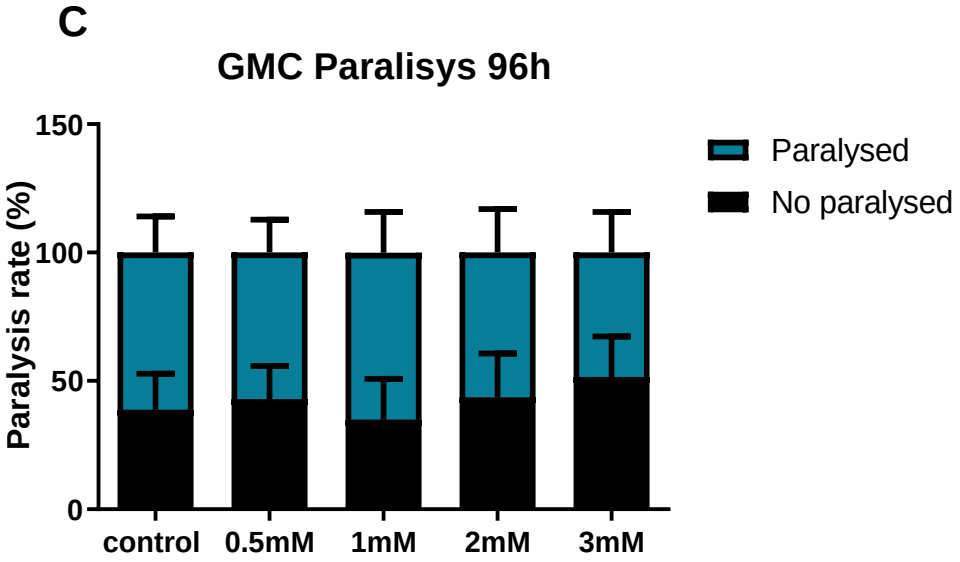
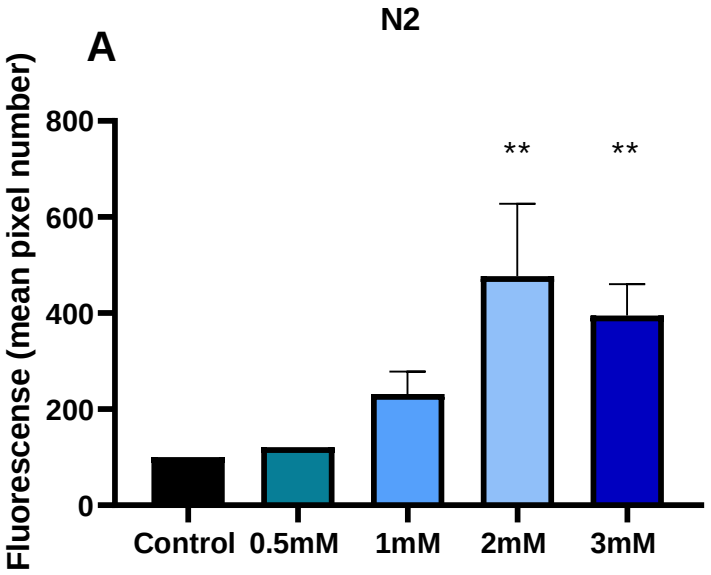


Figure 1. Evaluation of the paralysis rate of Fe-treated worms at 48h, 72h and 96h. The GMC101 were exposed to 25ºC when they reached the L4 stage. Paralysis rate of the GMC101 strain after 48h (A), 72h (B) and 96h (C).



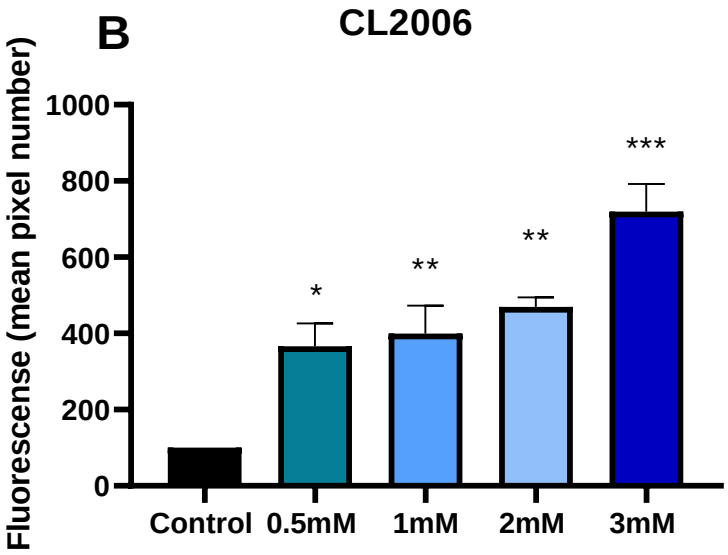


Figure 2. Oxidative species from the wild type and CL2006 strains at the different concentrations after exposure to Fe. Quantification of fluorescence. (A) Wild type and (B) CL2006. Significance was determined using One way ANOVA followed by Tukey's post test. Symbols show significant differences in relation to the control group: *<0.05; ** p <0.01 and *** p <0.001.

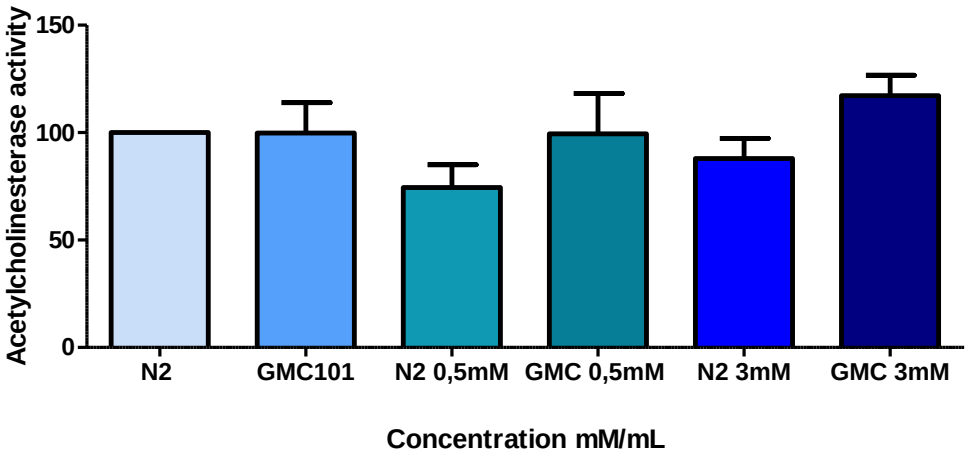


Figure 3. Ache activity showed no significant change in strains N2 and GMC101 after treatment with Fe at concentrations of 0.5mM and 3mM. The results showed no significant difference when compared with the wild strain (N2). One-way ANOVA followed by Tukey's post test. (At least three independent experiments were performed)

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos podemos concluir que uma única exposição precoce ao Sulfato de Ferro (II) possui a capacidade de induzir o fenótipo de paralisia em *Caenorhabditis elegans*, entretanto, não ocorreu uma diferença significativa na mensuração do número de agregados na marcação com a Thioflavina-S. Sendo assim, essa exposição pode contribuir com a neuroinflamação causando um aumento no fenótipo de paralisia. Essa exposição também levou a diminuição da sobrevivência, longevidade e alterações nos parâmetros de natação do verme, como a velocidade média e distância percorrida. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar a fundo qual a capacidade de uma exposição ao Sulfato de ferro (II) causar alterações nos agregados beta-amilóide em *C. elegans.*

7. PERSPECTIVAS

Uma das perspectivas futuras é melhorar a quantificação de agregados amilóides utilizando *C. elegans* e avaliar no quinto dia de vida do verme, para conseguir avaliar uma possível diferença significativa. Também pode-se realizar a quantificação da expressão do peptídeo através de Western Blotting.

A avaliação da expressão das diferentes proteínas reguladoras, transportadoras e armazenadoras de ferro são de grande importância, para elucidar melhor os efeitos de uma exposição a altas concentrações desse metal. Assim como a quantificação de ferro ingerida pelo verme.

Espero que esse trabalho incentive outros projetos e que eu tenha aberto uma porta para mais estudos.

8. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, A. G.; MARFIL, V.; LI, C. Use of Caenorhabditis elegans as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Frontiers in genetics**, v. 5, n. JUL, 2014.

ALMEIDA FAGUNDEZ, D. DE *et al.* Behavioral and dopaminergic damage induced by acute iron toxicity in Caenorhabditis elegans. **Toxicology Research**, v. 4, n. 4, p. 878–884, 1 jul. 2015.

ANDERSON, C. P. *et al.* Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 9, p. 1468–1483, set. 2012.

ANDERSON, C. P.; LEIBOLD, E. A. Mechanisms of iron metabolism in Caenorhabditis elegans. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, 2014a.

___. Mechanisms of iron metabolism in caenorhabditis elegans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, p. 113, 2014b.

ARMSTRONG, R. A. Risk factors for Alzheimer's disease. **Folia neuropathologica**, v. 57, n. 2, p. 87–105, 2019.

AVILA, J. *et al.* Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. **Physiological reviews**, v. 84, n. 2, p. 361–384, abr. 2004.

AYTON, S. *et al.* Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. **Nature communications**, v. 6, 19 maio 2015.

___. Regional brain iron associated with deterioration in Alzheimer's disease: A large cohort study and theoretical significance. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 17, n. 7, p. 1244–1256, 1 jul. 2021.

AYTON, S.; DIOUF, I.; BUSH, A. I. Evidence that iron accelerates Alzheimer's pathology: a CSF biomarker study. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 89, n. 5, p. 456–460, 1 maio 2018.

AYTON, S.; JAMES, S. A.; BUSH, A. I. Nanoscale Imaging Reveals Big Role for Iron in Alzheimer's Disease. **Cell chemical biology**, v. 24, n. 10, p. 1192–1194, 19 out. 2017.

BATISTA-NASCIMENTO, L. *et al.* Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

BECERRIL-ORTEGA, J. *et al.* Iron overload accelerates neuronal amyloid-β production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 35, n. 10, p. 2288–2301, 2014.

BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of neurochemistry**, v. 139 Suppl, p. 179–197, out. 2016a.

___. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of neurochemistry**, v. 139 Suppl 1, p. 179–197, 1 out. 2016b.

BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, 1 dez. 2020a.

___. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, 8 dez. 2020b.

BUTLER, L. G. Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. **Basic life sciences**, v. 59, p. 693–698, 1992.

CALDWELL, K. A.; WILLICOTT, C. W.; CALDWELL, G. A. Modeling neurodegeneration in Caenorhabditiselegans. **Disease models & mechanisms**, v. 13, n. 10, 1 out. 2020.

CHEN, L. L. *et al.* The metal ion hypothesis of Alzheimer's disease and the anti-neuroinflammatory effect of metal chelators. **Bioorganic chemistry**, v. 131, 1 fev. 2023.

CHEN, M. *et al.* High Dietary Iron Disrupts Iron Homeostasis and Induces Amyloid-β and Phospho-τ Expression in the Hippocampus of Adult Wild-Type and APP/PS1 Transgenic Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 149, n. 12, p. 2247–2254, 1 dez. 2019.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, 2015.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role for Caenorhabditis elegans in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 6, p. 869–877, 12 abr. 2000.

DAGLAS, M.; ADLARD, P. A. The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 981, dez. 2018a.

___. The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, 20 dez. 2018b.

DAWKINS, E.; SMALL, D. H. Insights into the physiological function of the β-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 129, n. 5, p. 756–769, 2014.

DIXON, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 25 maio 2012.

DORNELLES, A. S. *et al.* mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period. **Neurochemical research**, v. 35, n. 4, p. 564–571, abr. 2010.

DU, L. *et al.* Increased Iron Deposition on Brain Quantitative Susceptibility Mapping Correlates with Decreased Cognitive Function in Alzheimer's Disease. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1849–1857, 18 jul. 2018.

E, TÖNNIES; E, TRUSHINA. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 57, n. 4, p. 1105–1121, 2017.

EARLEY, B. J. *et al.* Zinc homeostasis and signaling in the roundworm C. elegans. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1868, n. 1, 1 jan. 2021.

FARINA, M. *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 575–594, 2013.

FREDRIKSSON, A. *et al.* Neonatal iron exposure induces neurobehavioural dysfunctions in adult mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 25–30, 15 ago. 1999.

GALE, S. A.; ACAR, D.; DAFFNER, K. R. Dementia. **The American journal of medicine**, v. 131, n. 10, p. 1161–1169, 1 out. 2018.

GOEDERT, M. *et al.* PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode Caenorhabditis elegans. **Journal of cell science**, v. 109 (Pt 11), n. 11, p. 2661–2672, nov. 1996.

GREENOUGH, M. A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A. I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 540–555, abr. 2013.

GRIFFIN, E. F.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A. **Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using Caenorhabditis elegansACS Chemical Neuroscience**American Chemical Society, , 20 dez. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29022701/>. Acesso em: 9 jun. 2021

HAGEMEIER, J.; GEURTS, J. J. G.; ZIVADINOV, R. Brain iron accumulation in aging and neurodegenerative disorders. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 12, n. 12, p. 1467–1480, dez. 2012.

HALLGREN, B.; SOURANDER, P. The non-haemin iron in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 5, n. 4, p. 307–310, 1960.

HAMBRIGHT, W. S. *et al.* Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. **Redox biology**, v. 12, p. 8–17, 1 ago. 2017.

HARE, D. J. *et al.* Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? **Nature reviews. Neurology**, v. 11, n. 9, p. 536–544, 7 set. 2015.

HORNSTEN, A. *et al.* APL-1, a Caenorhabditis elegans protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 6, p. 1971–1976, 6 fev. 2007.

JAMES, S. A. *et al.* Iron, Copper, and Zinc Concentration in Aβ Plaques in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Correlates with Metal Levels in the Surrounding Neuropil. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 629–637,

15 mar. 2017.

JIANG, H. *et al.* Brain Iron Metabolism Dysfunction in Parkinson's Disease. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 4, p. 3078–3101, 1 maio 2017.

JOPPE, K. *et al.* The contribution of iron to protein aggregation disorders in the central nervous system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JAN, p. 15, 2019.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–399, abr. 2006.

KAUR, D. *et al.* Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. **Neurobiology of aging**, v. 28, n. 6, p. 907–913, jun. 2007.

KLANG, I. M. *et al.* Iron promotes protein insolubility and aging in C. elegans. **Aging (Albany NY)**, v. 6, n. 11, p. 975, 2014.

KOPPENOL, W. H.; HIDER, R. H. Iron and redox cycling. Do's and don'ts. **Free radical biology & medicine**, v. 133, p. 3–10, 1 mar. 2019.

LI, L. *et al.* The association between apolipoprotein E and gallstone disease: an updated meta-analysis. **BMC medical genetics**, v. 20, n. 1, 14 jun. 2019.

LINK, C. D. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic Caenorhabditis elegans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9368–9372, 26 set. 1995.

LOZOFF, B. *et al.* Iron-fortified vs low-iron infant formula: developmental outcome at 10 years. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 166, n. 3, p. 208–215, mar. 2012.

LU, C. *et al.* Toxicity interactions between manganese (Mn) and lead (Pb) or cadmium (Cd) in a model organism the nematode C. elegans. **Environmental science and pollution research international**, v. 25, n. 16, p. 15378–15389, 1 jun. 2018.

MANGIALASCHE, F. *et al.* Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. **The Lancet. Neurology**, v. 9, n. 7, p. 702–716, jul. 2010.

MANTYH, P. W. *et al.* Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. **Journal of neurochemistry**, v. 61, n. 3, p. 1171–1174, 1993.

MARTINEZ-FINLEY, E. J. *et al.* Insights from Caenorhabditis elegans on the role of metals in neurodegenerative diseases. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 3, n. 3, p. 271–279, mar. 2011.

MARTORELL, P. *et al.* A nutritional supplement containing lactoferrin stimulates the immune system, extends lifespan, and reduces amyloid β peptide toxicity in Caenorhabditis elegans. **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 2, p. 255, mar. 2017.

MCCARTHY, R. C. *et al.* Characterization of a novel adult murine immortalized microglial cell line and its activation by amyloid-beta. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, 27 jan. 2016.

___. Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 20, p. 7853–7863, 18 maio 2018.

MCCARTHY, R. C.; PARK, Y.; KOSMAN, D. J. sAPP modulates iron efflux from brain microvascular endothelial cells by stabilizing the ferrous iron exporter ferroportin. **EMBO reports**, v. 15, n. 7, p. 809–815, jul. 2014.

MCCOLL, G. *et al.* Utility of an improved model of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$) toxicity in Caenorhabditis elegans for drug screening for Alzheimer's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 7, n. 1, 2012.

MCLACHLAN, D. R. C.; KRUCK, T. P.; *et al.* Would decreased aluminum ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease? **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, v. 145, n. 7, p. 793, 1991.

MCLACHLAN, D. R. C.; KRUCK, T. P. A.; *et al.* Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8753, p. 1304–1308, 1 jun. 1991.

MORCOS, M.; HUTTER, H. The model Caenorhabditis elegans in diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 16, n. 4, p. 897–908, 2009.

NATALE, C.; BARZAGO, M. M.; DIOMEDE, L. Caenorhabditis elegans Models to Investigate the Mechanisms Underlying Tau Toxicity in Tauopathies. **Brain sciences**, v. 10, n. 11, p. 1–17, 1 nov. 2020.

NICOLAI, M. M. *et al.* Manganese-Induced Toxicity in C. elegans: What Can We Learn from the Transcriptome? **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 18, 1 set. 2022.

PAL, A. *et al.* Iron in Alzheimer's Disease: From Physiology to Disease Disabilities. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, 1 set. 2022.

PASRICHA, S. R. *et al.* Iron deficiency. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10270, p. 233–248, 16 jan. 2021.

PENG, Y.; CHANG, X.; LANG, M. Iron Homeostasis Disorder and Alzheimer's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, 1 nov. 2021.

PETERS, D. G.; CONNOR, J. R.; MEADOWCROFT, M. D. The relationship between iron dyshomeostasis and amyloidogenesis in Alzheimer's disease: Two sides of the same coin. **Neurobiology of disease**, v. 81, p. 49–65, 1 set. 2015.

PIÑERO, D. J. *et al.* Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 254–263, 2000.

QUINTANA, C. *et al.* Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. **Journal of structural biology**, v. 153, n. 1, p. 42–54, jan. 2006.

RAND, J. B. Acetylcholine. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–21, 2007.

REVI, M. Alzheimer's Disease Therapeutic Approaches. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1195, p. 105–116, 2020.

SALLOWAY, S. *et al.* Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. **JAMA neurology**, v. 79, n. 1, p. 13–21, 2022.

SALVADOR, G. A.; URANGA, R. M.; GIUSTO, N. M. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, 2011.

SAYRE, L. M. *et al.* In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 270–279, 2000.

SMIALOWSKA, A.; BAUMEISTER, R. Presenilin function in Caenorhabditis elegans. **Neuro-degenerative diseases**, v. 3, n. 4–5, p. 227–232, out. 2006.

SOARES, F. A.; FAGUNDEZ, D. A.; AVILA, D. S. Neurodegeneration Induced by Metals in Caenorhabditis elegans. *In*: **Advances in Neurobiology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 18p. 355–383.

SOARES, M. V.; PUNTEL, R. L.; ÁVILA, D. S. Resveratrol attenuates iron-induced toxicity in a chronic post-treatment paradigm in Caenorhabditis elegans. **Free radical research**, v. 52, n. 9, p. 939–951, 2 set. 2018.

SPENCE, H.; MCNEIL, C. J.; WAITER, G. D. Cognition and brain iron deposition in whole grey matter regions and hippocampal subfields. **The European journal of neuroscience**, v. 56, n. 11, p. 6039–6054, 1 dez. 2022.

STOCKWELL, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 273–285, 5 out. 2017.

TIWARI, S. *et al.* Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 5541–5554, 2019.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, p. 1105–1121, 2017.

TURNER, B. J.; HOJAT, M.; GONNELLA, J. S. Using ratings of resident competence to evaluate NBME examination passing standards. **Journal of medical education**, v. 62, n. 7, p. 572–581, 1987.

VILLAIN, N.; DUBOIS, B. Alzheimer's Disease Including Focal Presentations. **Seminars in neurology**, v. 39, n. 2, p. 213–226, 2019.

VIOLA, K. L.; KLEIN, W. L. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. **Acta neuropathologica**, v. 129, n. 2, p. 183–206, 24 jan. 2015.

WALSH, S. *et al.* Aducanumab for Alzheimer's disease? **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 374, 5 jul. 2021.

WANG, C. Y.; BABITT, J. L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood**, v. 133, n. 1, p. 18–29, 3 jan. 2019.

WANG, F. *et al.* Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis: A New Alzheimer's Disease Hypothesis? **Frontiers in aging neuroscience**, v. 14, 22 mar. 2022.

WARD, R. J. *et al.* The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **The Lancet. Neurology**, v. 13, n. 10, p. 1045–1060, 1 out. 2014.

WESSLING-RESNICK, M. Excess iron: Considerations related to development and early growth. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. Suppl 6, p. 1600S-1605S, dez. 2017.

WESTLUND, B. *et al.* Reverse genetic analysis of Caenorhabditis elegans presenilins reveals redundant but unequal roles for sel-12 and hop-1 in Notch-pathway signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2497–2502, 2 mar. 1999.

WONG, B. X. *et al.* β-Amyloid precursor protein does not possess ferroxidase activity but does stabilize the cell surface ferrous iron exporter ferroportin. **PloS one**, v. 9, n. 12, 2 dez. 2014.

YI, B. *et al.* Small molecule modulator of sigma 2 receptor is neuroprotective and reduces cognitive deficits and neuroinflammation in experimental models of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 140, n. 4, p. 561–575, 1 fev. 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in C. elegans via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. **European journal of pharmacology**, v. 919, 15 mar. 2022.

ZHANG, Y.; HE, M. LIN. Deferoxamine enhances alternative activation of microglia and inhibits amyloid beta deposits in APP/PS1 mice. **Brain research**, v. 1677, p. 86–92, 15 dez. 2017.

ZHAO, N. *et al.* Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. **Biological psychiatry**, v. 83, n. 4, p. 347–357, 15 fev. 2018.

ZHEN, M.; SAMUEL, A. D. T. C. elegans locomotion: small circuits, complex functions. **Current opinion in neurobiology**, v. 33, p. 117–126, 1 ago. 2015.

ZHOU, Z. D.; TAN, E. K. Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. **Molecular neurodegeneration**, v. 12, n. 1, 23 out. 2017.