

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

Thayanara Cruz da Silva

**INVESTIGAÇÃO PÓS-TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM ADENOSINA
EXÓGENA NO NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans*.**

Santa Maria, RS

2021

PPGBTOX\UFSM, RS

DA SILVA, THAYANARA CRUZ

Thayanara Cruz da Silva

**INVESTIGAÇÃO PÓS-TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM ADENOSINA
EXÓGENA NO NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Professora Dra. Cristiane Lenz Dalla Corte

Santa Maria, RS

2021

DA SILVA, THAYANARA CRUZ DA SILVA
INVESTIGAÇÃO PÓS-TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM
ADENOSINA EXÓGENA NO NEMATÓIDE *Caenorhabditis elegans*. /
THAYANARA CRUZ DA SILVA DA SILVA.- 2021.
65 p.; 30 cm

Orientadora: Cristiane Lenz Dalla Corte
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2021

1. Adenosina 2. *C.elegans* 3. Estresse Oxidativo 4.
Defesas antioxidantes 5. Fisiologia e comportamento I.
Lenz Dalla Corte, Cristiane II. Título.

Thayanara Cruz da Silva

INVESTIGAÇÃO PÓS-TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM ADENOSINA
EXÓGENA NO NEMATÓIDE *Caenorhabditis elegans*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 25 de junho de 2021

Cristiane Lenz Dalla Corte

Dr^a. Cristiane Lenz Dalla Corte (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientadora)



Dr^a. Maria Rosa Chitolina (UFSM) - Videoconferência
(Avaliadora/Membro interno)



Dr^a. Riva de Paula Oliveira (UFRN) - Videoconferência
(Avaliadora/Membro externo)

Santa Maria, RS

2021

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Andréa Cruz que mesmo com todas as dificuldades que a vida nos trouxe nunca desistiu de acreditar e incentivar meus sonhos, obrigada por ser mãe e pai ao mesmo tempo. Ao meu irmão Henrique Cruz por ser meu porto, mesmo com as inúmeras diferenças, nada teria sentido sem tua presença, te amo. A minha Vó Maria do Carmo da Cruz que é a maior referência de amor e carinho que conheço, sempre estive ao meu lado apoiando e com alegria me incentivando a progredir, não tenho palavras para te descrever Vó. A minha bisavó Celanira Vieira da Cruz por ser o exemplo de fé, força e coragem, o espelho da esperança e união da família. As minhas tias Daniele da Cruz e Elisiane Rosso, por todo companheirismo, confiança e força.

A todos os integrantes da família Cruz, tenho muito orgulho do espaço que cresci no Passo das tropas, da função de lidar no campo, cuidando dos animais e da natureza que nos cercam. Os momentos mais simples com vocês se tornam únicos, as risadas, as cantorias, as danças, a união, as palavras do dicionário que só nós usamos, a alegria de estar com vocês não existe em outro lugar, obrigada por toda riqueza que vocês me transmitem.

Aos meus amigos por estarem ao meu lado desde o início e permanecerem até o fim, Mônica Mello, Marcelli Ignácio, Adele Henriques e Cristian Denis, vocês têm um espaço reservado dentro do meu coração, obrigada pelas longas conversas pelo apoio e por todo carinho e amor que foi essencial durante esse período.

A professora Dr^a.Cristiane Lenz Dalla Corte, que aceitou orientar-me, ao professor Dr^o Felix Soares, pela oportunidade de pesquisar no laboratório que está entre as melhores referências de utilização de *Caenohabdties elegans* da América Latina. Obrigada, por permitir tantas experiências desde o tempo da graduação, a SBBQ, os almoços no RU, por puxar muito as minhas orelhas! Pelas reuniões do lab, e por poder dizer que fiz parte do Laboratório de Neurotoxicologia e Neuroproteção Experimental – La (Ne)2Ex. Ambos, obrigada pelo espaço de pesquisa, que moldou a estudante que sou hoje, obrigada pelas correções nos seminários, pela confiança e por acreditarem no meu crescimento.

A todos os integrantes do laboratório, aos que participaram ativamente da formulação deste trabalho, compartilhando principalmente o tempo e conhecimento para realizar os experimentos. Por não recuarem frente aos desafios que foram surgindo, obrigada Dr^a Letícia Arantes, Rodrigo Martins, Luiza Venturinni e Débora Marques, vocês tornaram os dias mais alegres e leves, obrigada pelos momentos dentro e fora do arco.

A todos os professores, colegas e funcionários do PPGBTOX que participaram desta jornada! Em especial à Elvandir Guimarães, obrigada Dica pela atenção, cuidado, disponibilidade e auxílio em todas as questões que foram surgindo ao longo do caminho.

A Universidade Federal de Santa Maria, instituição pública, gratuita e de qualidade, local que tenho orgulho de estar e querer continuar. As instituições de fomento, CAPES, CNPq, FAPERGS, obrigada pelo apoio financeiro para a obtenção dos equipamentos, reagentes e todos os materiais que possibilitaram o título. A ciência brasileira precisa de todos vocês!

Obrigada! Muito obrigada!

“Acredito que minha verdadeira aptidão seja iniciar projetos. O que eu gosto, mesmo, é de começar o jogo. E, depois que se inicia, começo a sentir que está ficando monótono.... Aí quero ir para outros projetos... muitos pesquisadores foram além e fizeram importante trabalho científico, mas todos se recordam daqueles momentos maravilhosos em que nós e nossa ciência éramos jovens e nossa empolgação em perseguir novos desafios não tinha fim...”.

(Autobiográfica de SYDNEY BRENNER, Minha Vida na Ciência, 2001)

RESUMO

INVESTIGAÇÃO PÓS-TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM ADENOSINA EXÓGENA NO NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans*.

AUTORA: THAYANARA CRUZ DA SILVA
ORIENTADORA: CRISTIANE LENZ DALLA CORTE
Santa Maria 25, Junho de 2021.

A adenosina é uma purina, que tem funções biológicas importantes para o metabolismo celular, além de muitas pesquisas relacionarem seu uso à neuromodulação. *Caenorhabditis elegans* é um nematoide, não parasita, encontrado na natureza em ambientes úmidos, apresenta muitas vantagens como modelo experimental alternativo para testes de baixo custo e curta duração. Uma vez que há escassas evidências de um sistema de sinalização purinérgica (SSP) e de ações diretas da adenosina no verme, acerca de sua fisiologia, comportamentos e respostas ao estresse oxidativo, faz-se necessário tal estudo. Foi realizado um tratamento agudo de 1h em meio líquido com as concentrações finais de 1, 5 e 10 mM de adenosina. Avaliamos o bombeamento da musculatura faríngea, ritmo de defecação, morfologia, comportamento locomotor. Avaliamos a sobrevivência em condições de estresse induzido por juglone ou calor térmico, níveis da enzima antioxidante SOD-3 e a localização do fator de transcrição DAF-16 (FOXO ortólogo em mamíferos). Também avaliamos a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Posteriormente, foi realizado um tratamento crônico de 38h com adenosina no qual observamos comportamentos básicos e os níveis de SKN-1, *gsc-1* e HSP16.2, por meio da quantificação da fluorescência da proteína repórter GFP. A Adenosina não alterou a morfologia dos vermes, nem interferiu no comportamento reprodutivo. Por outro lado, a adenosina retarda o ritmo de defecação, bombeamento faríngeo, e a locomoção, além de participar ativando ou inibindo as vias de resposta ao estresse em *C. elegans*. Juntos, esses resultados contribuem para o entendimento da atividade fisiológica e bioquímica da adenosina nesse nematoide.

Palavras-chaves: Sistema de Sinalização Purinérgica, Adenosina, *Caenorhabditis elegans*, Modelo alternativo, Neuromodulação, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

ACUTE AND CHRONIC POST-TREATMENT INVESTIGATION WITH EXOGENOUS ADENOSINE IN THE NEMATOID *Caenorhabditis elegans*.

AUTHOR: THAYANARA CRUZ DA SILVA

SUPERVISOR: CRISTIANE LENZ DALLA CORTE

Santa Maria 25, June 2021.

Adenosine is a purine, which has important biological functions for cell metabolism, in addition to many researches relating its use to neuromodulation. *Caenorhabditis elegans* is a non-parasitic nematode found in nature in humid environments, and it has many advantages as an alternative experimental model because of its low cost and short duration of tests. Since there is little evidence of a purinergic signaling system (PSS) and of direct purine actions in the worm, regarding its physiology, behaviors and responses to oxidative stress, such a study is necessary. We performed an acute treatment of 1h in liquid medium with final concentrations of 1, 5 and 10 mM of adenosine. We evaluated pharyngeal muscle pumping, defecation rate, morphology, locomotor behavior. We evaluated survival under conditions of stress induced by juglone or thermal heat, levels of the antioxidant enzyme SOD-3 and the localization of the transcription factor DAF-16 (orthologous FOXO in mammals). We also evaluated the formation of reactive oxygen species. Subsequently, a chronic treatment of 38h with adenosine was carried out, in which we observed basic behaviors and levels of SKN-1, gsc-1 and HSP16.2, by quantifying the fluorescence of the GFP reporter protein. Adenosine did not alter the worms' morphology, nor did it interfere with their reproductive behavior. On the other hand, adenosine slows the rate of defecation, pharyngeal pumping, and locomotion, in addition to participating in activating or inhibiting the stress response pathways in *C. elegans*. Together, these results contribute to the understanding of the physiological and biochemical activity of adenosine in this nematode.

Keywords: Purinergic Signaling System, Adenosine, *Caenorhabditis elegans*, Alternative model, Neuromodulation, Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Vias de liberação de ATP, receptores e enzimas degradantes envolvidas na sinalização purinérgica	16
Figura 2. Ciclo de vida do nematoide <i>Caenorhabditis elegans</i> à 22 °C	18
Figura 3. Uma ilustração esquemática da lógica subjacente à expressão de proteínas verdes fluorescentes (GFP) com a expressão de fatores como DAF-16 e <i>sod-3</i>	19
Figura 4. Sinalização da via MAPK em <i>C. elegans</i>	24
Figura 5. Modelo das vias de sinalização DAF-2 insulina / IGF e seus moduladores	27

MANUSCRITO

Figura 1. Análise fisiológica e reprodutiva de <i>C. elegans</i> pós tratamento agudo e crônico com adenosina (mM).....	42
Figura 2. Avaliação do sistema locomotor de <i>C. elegans</i> pós tratamento agudo e crônico com adenosina (mM);.....	43
Figura 3. Comportamentos de mobilidade de <i>C. elegans</i> pós tratamento agudo e crônico com adenosina (mM);.....	43
Figura 4. Comportamentos de Resposta neurotóxica de <i>C. elegans</i> pós tratamento agudo e crônico com adenosina (mM);.....	44
Figura 5. Sobrevivência após indução de estresse por juglone 200 µM e por calor (35 °C), pós tratamento agudo de adenosina (mM);.....	44
Figura 6. Localização nuclear do fator de transcrição DAF-16 em <i>C. elegans</i> pós tratamento agudo e crônico de adenosina (mM) ;	44
Figura 7. Unidades arbitrárias de fluorescência da cepa mutante CF 1553 (<i>sod-3</i> mitocondrial::GFP) de <i>C. elegans</i> após tratamento agudo com adenosina (mM).....	45
Figura 8. Quantificação de ROS em <i>C. elegans</i> selvagens após tratamento agudo com adenosina (mM).....	46
Figura 9. Efeito do tratamento crônico com adenosina 10 mM e estresse térmico (37 °C) nas cepas mutantes de <i>C. elegans</i> , LD-1 com GFP associado à expressão de SKN-1, LD1171 associado à expressão de <i>gsc-1</i> , CL2070 associado à expressão de HSP 16.2.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleteo
A2A	Receptor De Adenosina De Tipo 2a
A2B	Receptor De Adenosina De Tipo 2b
A2C	Receptor De Adenosina De Tipo 2c
A3	Receptor De Adenosina De Tipo A3
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AGE-1	Ageing Alteration-1
AKT-1	Proteína Quinase -1
AKT-2	Proteína Quinase -2
AMP	Adenosina Monofosfato;
ATP	Adenosina Trifosfato;
CM-H2DCFDA	Clorometil Diclorofluoresceína Diacetato;
DAF-16	Abnormal Dauer Formation - 16
DAF-2	Abnormal Dauer Formation - 2
DAF-28	Abnormal Dauer Formation - 28
EROS	Espécies Reativas De Oxigênio
E-NTPDase	Ectonucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
E-ADA	Ecto Adenosina Deaminase
<i>GCS-1</i>	Glutamylcysteine Synthetase -1
GFP	Green Fluorescent Protein - Proteína Verde Fluorescente
HSP	Heat Shock Protein - Proteínas De Choque Térmico
HSP 16.2	Proteína De Choque Térmico 16.2;
ILPS	Insulin-Like Peptides;
L1	Estágio Larval 1;
L2	Estágio Larval 2;
L3	Estágio Larval 3;
L4	L4- Estágio Larval 4;
MAPK	Mapk - Proteína Quinase Ativada Por Mitogênio;
NGM	Ngm - Meio De Crescimento Para Nematoides;

NTPDASE1	Trifosfato De Ecto-Nucleotídeo Difosfo-Hidrolases Tipo 1;
NTPDASE2	Trifosfato De Ecto-Nucleotídeo Difosfo-Hidrolases Tipo 2
$O_2^{\cdot -}$	Ânion Superóxido
OH^{\cdot}	Radical Hidroxil;
P1	Receptor Purinérgico 1
P2	Receptor Purinérgico 2
P2X	Receptor Purinérgico Inotrópico
A1	Receptor De Adenosina
P2Y	Receptor Purinérgico Metabotrópico;
PIP2	Fosfatidilinositol Bisfosfato;
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato
PSS	Purinergic Signaling System
RNAi	Ácido Ribonucleico de Interferência;
SKN-1	Protein Skinhead-1
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD-3	Superóxido Dismutase
SSP	Sistema de Sinalização Purinérgica
VNUT-1	Transportador Vesicular De Nucleotídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Sinalização purinérgica e seus componentes	15
1.2 Modelo alternativo	17
1.3 <i>C. elegans</i> e o SSP	19
1.4 Estresse oxidativo e vias de defesas antioxidantes	21
1.5 Resistência ao estresse em <i>C. elegans</i>	23
1.6 Fatores de transcrição	24
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MANUSCRITO	30
Abstract	30
1. Introduction	31
2. Materials and methods	32
2.1. Strains and culture conditions	32
2.2 Treatment	33
2.2.1. Acute Treatment	33
2.2.2. Chronic treatment	33
2.3 Morphological parameters and locomotor activity	33
2.4 Reproductive behavior	34
2.4.1 Egg laying	34
2.4.2 Egg production	34
2.5 Pharyngeal pumping	34
2.6 Defecation rate	34
2.7 Survival analysis test after thermal and chemical stress	34
2.7.1 Thermal stress	34
2.7.2 Chemical stress	34
2.8 ROS production	35
2.9 Analysis of the subcellular location of DAF-16	35
2.10 Quantification of SKN-1, gsc-1, HSP16.2 and SOD-3 levels	35
2.11 Statistic	36
3 Results	36

3.1 Adenosine does not interfere with morphological development and reproductive behavior in wild type <i>C. elegans</i>.	36
3.2 Adenosine interferes with pharynx pumping and defecation rhythm in <i>C. elegans</i>.	36
3.3 Acute and chronic adenosine affects locomotor behavior in <i>C. elegans</i>.	36
3.4 Adenosine does not change the survival rate of wild type worms after stress induction.	37
3.5 Acute and chronic adenosine modulates DAF-16 activation in <i>C. elegans</i>.	37
3.6 Chronic adenosine modulates SKN-1 and HSP 16.2 but not gsc-1 after thermal stress in <i>C. elegans</i>.	37
3.7 Acute treatment with adenosine increases ROS production and SOD-3 levels in <i>C. elegans</i>.	37
4. Discussion	38
5. Conclusion	41
6. Figures	42
7. References	49
5 CONCLUSÃO	55
6 PERSPECTIVAS	56
7 BIBLIOGRAFIA	56

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** consta uma revisão da literatura sobre os temas trabalhados.

A metodologia realizada e os resultados obtidos estão apresentados no item **MANUSCRITO** sob a forma de um manuscrito redigido em inglês. No mesmo constam as sessões: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens **CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**, apresentam conclusões gerais sobre os resultados do manuscrito e as perspectivas para trabalhos futuros.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO**.

1 INTRODUÇÃO

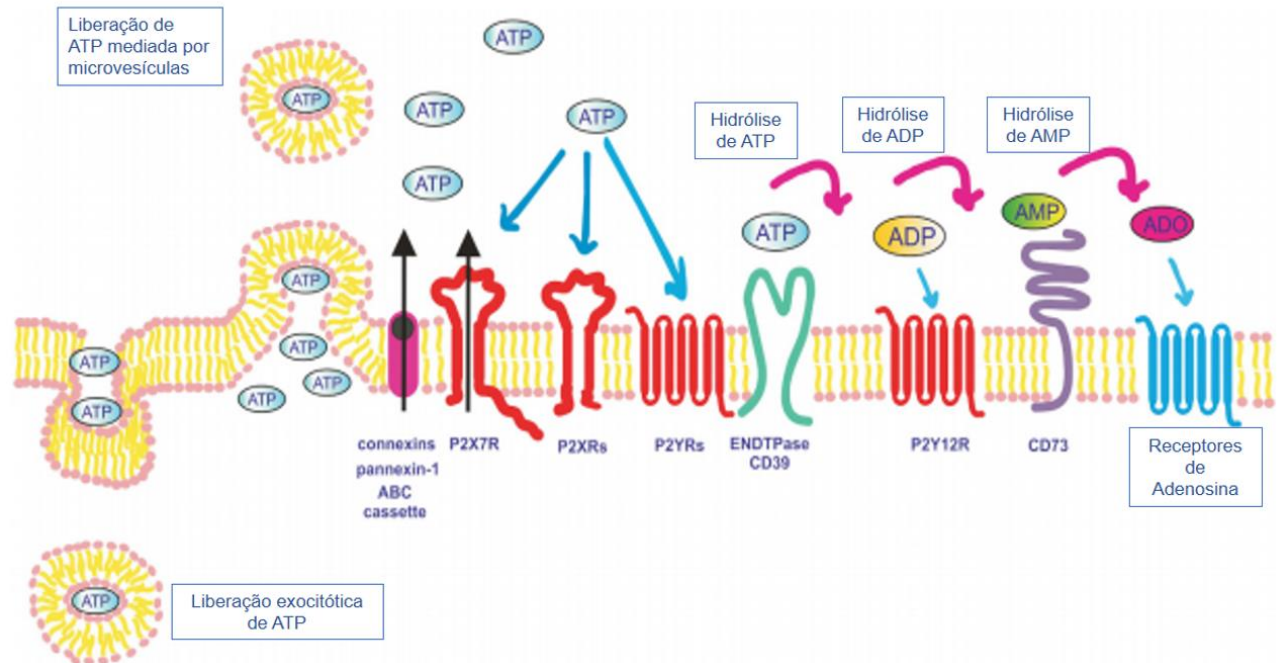
1.1 Sinalização purinérgica e seus componentes

A sinalização purinérgica tem suas funções particularmente desempenhadas pela participação de biomoléculas como os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP), e seu derivado nucleosídico adenosina (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Três componentes principais fazem parte do sistema purinérgico: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, seus receptores e as ectoenzimas (YEGUTKIN, 2008). Em 1929, foram descritas pela primeira vez as ações da aplicação extracelular de compostos de adenina no coração humano relacionada com a pressão arterial (DRURY & SZENT-GYÖRGYI, 1929). Após mais pesquisas, a adenosina trifosfato (ATP) foi proposta como o responsável pela transmissão não-adrenérgica e não-colinérgica no intestino e na bexiga (BURNSTOCK *et al.*, 1970). O conceito de sinalização purinérgica começou a ser utilizado em 1972, atualmente está bem estabelecido que seus componentes atuam como mensageiros extracelulares, capazes de sinalizar uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular (BURNSTOCK, 1972 2006).

A sinalização purinérgica (Figura 1) é uma importante via moduladora de variados processos fisiológicos, envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária entre outros. Essa sinalização parece ser um sistema evolutivo primitivo, foi identificada em praticamente todos os tecidos e tipos de células demonstrando-se a mais generalizada e onipresente dentre todas as moléculas de sinalização extracelular conhecidas (BURNSTOCK, 2006; VERKHRATSKY & BURNSTOCK, 2014; DE TORRE-MINGUELA, C. *et al.*, 2016). Sabe-se que ambos, nucleotídeos de pirimidina e purina, são liberados das células através de vários mecanismos fisiológicos, incluindo a difusão através de membrana, a ativação de transportadores de membrana e a exocitose vesicular (ABBRACCHIO *et al.*, 2009; BURNSTOCK, 2007; NORTH & VERKHRATSKY, 2006; PANKRATOV *et al.*, 2006). Essas moléculas também demonstram participação na neurotransmissão (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). A concentração de ATP extracelular e adenosina, são controlados por algumas ectoenzimas, em especial pela ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e a ecto-adenosina deaminase (E-ADA), ancoradas extracelularmente (ZIMMERMANN, 2001).

Figura 1: Vias de liberação de ATP, receptores e enzimas degradantes envolvidas na sinalização purinérgica. O ATP é liberado no espaço extracelular por meio de vesículas secretoras (exocitose), microvesículas derivadas da membrana plasmática, transportadores (por exemplo, cassetes ABC), canais (por exemplo, panexina-1 ou conexinas) ou através

do próprio receptor P2X7R. Uma vez no meio extracelular, o ATP atua nos receptores P2X e P2Y, e também é hidrolisado em ADP e AMP pelas ENTPDases como a CD39. ADP ativa P2YR12 e é posteriormente degradado em adenosina (ADO) pelo CD73. A adenosina gerada por CD73 ativa os receptores de adenosina (P1) e é degradada em inosina pela adenosina desaminase.



Fonte: Oncogene (2017) 36, 293–303; doi:10.1038/onc.2016.206; published online 20 June 201

A proliferação, diferenciação e morte celular que ocorrem no desenvolvimento e regeneração também são mediadas por receptores purinérgicos (ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK & VERKHRATSKY, 2010). A degradação extracelular do ATP liberado por enzimas ectonucleotidases, incluindo E-NTPDases, E-NPPS, fosfatase alcalina e ecto5'-nucleotidase (YEGUTKIN, 2008) é um processo fisiologicamente relevante, pois metabólitos de ATP também são agonistas de diferentes receptores purinérgicos. Quatro subtipos diferentes de receptores P1, A1, A2A, A2B e A3, foram clonados e caracterizados. Os DNAs complementares que codificam para dois subtipos de receptor P1 (A1 e A2) foram isolados em 1989 (LIBERT *et al.*, 1989; FREDHOLM *et al.*, 2001). Logo depois, o subtipo A3 foi identificado (ZHOU *et al.*, 1992), e recentemente o receptor de adenosina A2C (para olfato em peixes zebra) foi encontrado, este reconhece apenas a adenosina, mas não o ATP, nucleotídeos relacionados ou outros nucleosídeos (WAKISAKA *et al.*, 2017).

As moléculas do SSP ativam duas classes de receptores: (i) receptores metabotrópicos P1, ativados pela adenosina; e (ii) a família P2 de receptores de nucleotídeos que são subdivididos em

subclasses metabotrópicas P2Y e ionotrópicas P2X. P1 e P2 estão envolvidos na neurotransmissão e neuromodulação no sistema nervoso central (SNC) e no comportamento normal, incluindo memória, alimentação, locomoção e cognição (BURNSTOCK *et al.*, 2011). Os efeitos nos neutrófilos ocorrem dentro da faixa fisiológica, com os receptores A1 estimulados em baixas concentrações (pM) e receptores A2 em concentrações mais elevadas (nM). A ativação dos receptores A1 de neutrófilos em resposta a N-formil-metionil-leucilfenilalanina participa do processo pró-inflamatório enquanto a ativação dos receptores A2 inibe a aderência ao endotélio e reduz a geração de espécies reativas de oxigênio (MCCALLION *et al.*, 2004).

A adenosina desempenha um papel fundamental no controle do metabolismo celular, além de funções restritas ao SNC sendo classificada como um neuromodulador (CUNHA, 2001). A adenosina é um metabólito da adenosina trifosfato (ATP), acumula-se em áreas onde o ATP é usado e atua em uma variedade de células, incluindo miócitos, mastócitos, macrófagos e neutrófilos (MCCALLION *et al.*, 2004).

As xantinas são alcaloides encontrados em diferentes vegetais com ampla distribuição geográfica. Podem ser classificadas em três principais grupos: 1. cafeína (1,3,7 – trimetilxantina); 2. teofilina (1,3-dimetilxantina); 3. teobromina: (3,7-dimetilxantina). As metilxantinas são considerados os estimulantes do SNC mais amplamente consumidos pelo homem, encontradas em chocolates, chás e outras bebidas (GILMAN *et al.*, 1991).

Há muitos estudos relacionando os receptores de adenosina à neuroproteção via xantinas e metilxantinas, essas moléculas apresentam suas afinidades variando de acordo com os diferentes subtipos de receptores de adenosina e suas estruturas químicas (CHEN *et al.*, 1999). Encontramos trabalhos com a cafeína e outras purinas em vertebrados (CHEN *et al.*, 2001; RUDOLPHI *et al.*, 1992) e em modelos alternativos invertebrados como o *C. elegans* que demonstram envolvimento da sinalização purinérgica e seus componentes (BRIDI *et al.* 2015; DU *et al.*, 2018).

1.2 Modelo alternativo

As pesquisas com *Caenorhabditis elegans* iniciaram-se em 1960, com o pesquisador Sydney Brenner investigando o desenvolvimento embrionário desta espécie em particular. Ele estava procurando por um organismo multicelular pequeno, que possuísse uma anatomia simples com poucas células, facilmente cultivado e com rápida reprodução. *C. elegans* tornou-se um dos modelos experimentais mais intensamente estudados e foi o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma totalmente sequenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998), levando a identificação molecular de muitos genes-chave em processos biológicos de desenvolvimento

celular (BRENNER 1988; 2002).

O *C. elegans*, é um pequeno nematoide de vida livre com aproximadamente 1 mm em estágio larval adulto, geralmente encontrado no solo em climas temperados em todo o mundo, nas manchas de material vegetal em decomposição, restritas espacial e temporalmente, ricas em micróbios que utiliza para nutrir-se. Esse verme pode ser encontrado também em ambientes aquáticos e pode ser mais facilmente isolado de frutas podres. Apresenta duas formas sexuais: hermafroditas que produzem esperma e ovos, ou machos (0,2% de frequência na população). Ao longo de 3-4 dias, cerca de 300 ovos são colocados (se o hermafrodita for fecundado por um macho esse número pode aumentar para cerca de 1000 ovos). Os embriões de *C. elegans* se desenvolvem rapidamente, em 60 h atingem o estágio adulto com ovos. O primeiro estágio larval é completado após 12 horas da eclosão, e os animais passam por quatro estágios de muda antes de se tornarem adultos (Figura 2). A ausência de alimentos, temperaturas elevadas ou abaixo do padrão que vivem (20 °C para cepa selvagem) e aglomeração de indivíduos, podem desencadear uma via de desenvolvimento alternativa que leva à larva *dauer*, que não se alimenta, mas pode sobreviver a condições adversas por vários meses. Quando as condições voltam a ser favoráveis, o desenvolvimento normal é retomado, os animais saem do estágio larval *dauer* e alcançam o quarto estágio larval normal antes de se tornarem adultos. O período de vida é de 2-3 semanas, facilitando estudos de longo prazo (BRENNER, 1988; 2002; FÉLIX, 2010).

Figura 2. Ciclo de vida do nematoide *Caenorhabditis elegans* à 22 °C

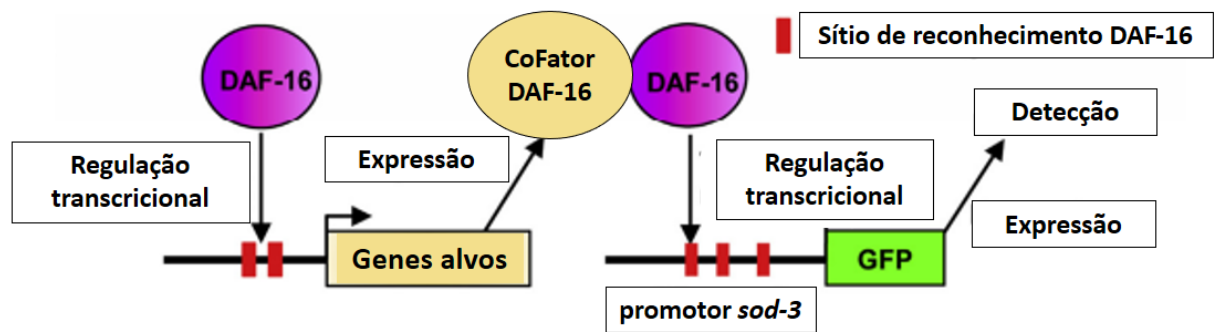


Fonte: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/19176/DIS_PPGCBBT_2019_SILVEIRA_TASSIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Devido à complexidade do cérebro de vertebrados e as limitações de modelos mamíferos, modelos invertebrados como o *C. elegans* tornaram-se mais utilizados para delinear mecanismos moleculares de neurodegeneração (BRENNER, 1974). Além disso, *C. elegans* possui um sistema nervoso composto de 302 neurônios em um hermafrodita adulto, no qual cada neurônio possui uma única posição e identidade que pode ser reproduzível (WHITE *et al.*, 1986).

O fato de que o *C. elegans* possui a cutícula transparente, e que é possível associar geneticamente a expressão de proteínas de interesse ao gene repórter GFP, os ensaios de microscopias ópticas (fluorescência ou confocal) possibilitam observar a presença de tais proteínas. (Figura 3) (VOLOVIK *et al.*, 2014; CORSI *et al.*, 2015).

Figura 3. Uma ilustração esquemática da lógica subjacente à expressão de proteínas verdes fluorescentes (GFP) com a expressão de fatores como DAF-16 e *sod-3*.



Fonte: Volovik, Y., Moll, L., Marques, F.C., Maman, M., Bejerano-Sagie, M., & Cohen, E. (2014). Differential regulation of heat shock factor 1 and DAF-16 by neuronal nhl-1 in the nematode *C. elegans*. *Cell Reports*, 9 (6), 2192-2205. doi: 10.1016 / j.celrep.2014.11.028 (adaptado e traduzido)

Outra vantagem interessante que o uso deste modelo possibilita são as análises genéticas através da supressão de genes pela alimentação do nematódeo com bactérias expressando RNAi, os vermes também são viáveis para verificar a eficácia de compostos farmacológicos em doenças. Por estas razões, *C. elegans* emergiu como um importante sistema modelo *in vivo* para o estudo de mecanismos patológicos em diversas desordens neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Amiotrófica Lateral e a Epilepsia (DIMITRIADI *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2020).

1.3 *C. elegans* e o SSP

O *C. elegans* se mostra como uma ferramenta simples em estudos de toxicidade. O verme

é sensível a uma série de substâncias, incluindo, metais pesados, toxinas orgânicas e uma ampla gama de drogas psicoativas de uso humano (RAND & JOHNSON, 1995; NASS & BLAKELY, 2003). Embora exista uma variedade de estudos sobre neuroproteção envolvendo o sistema purinérgico em roedores, não há descrição de um sistema purinérgico em *C. elegans* (ESPELT *et al.*, 2005). Assim como vários neurotransmissores em outros organismos cuja existência no verme não é clara, como glicina, purinas, histamina e vestígios de aminas (HOBERT, 2018). Porém, há alguns relatos de componentes do SSP nesta espécie, a subfamília SLC17A9 contém um transportador de nucleotídeos vesiculares e o genoma de *C. elegans* contém um gene com similaridade ao transportador vesicular de nucleotídeos (vnut-1) (SREEDHARAN *et al.*, 2010) ambos ainda não caracterizados. No entanto, não há homólogos óbvios de receptores de neurotransmissores purinérgicos (P2X) ou (P2Y) e, como tal, o substrato para vnut-1 não é claro. Os canais iônicos do tipo P2X, que são ativados diretamente pelo (ATP) (FOUNTAIN & BURNSTOCK, 2009), podem ser encontrados em todas as espécies de vertebrados, em espécies de invertebrados marinhos como moluscos e ouriços do mar, e até mesmo em fungos, mas parecem ter se perdido em *C. elegans* e *drosophila* (BAVAN *et al.*, 2009).

O *C. elegans* contém nove genes (oito dos quais constituem uma expansão específica de *C. elegans*) que são claros membros da superfamília SLC17, mas não mostram homologia com nenhuma subfamília SLC17 específica. Após a liberação sináptica, acredita-se que o ATP seja hidrolisado em ADP pelas ecto-ATPases, das quais existem três no genoma do verme (mig-23, ntp-1, uda-1), e a recaptação pode ocorrer por meio de transportadores de nucleosídeos concentrativos da Família SLC28 (CNT1,2,3 em mamíferos), da qual há dois no genoma do verme (slc-28.1 e slc-28.2), ambos não caracterizados. A absorção também pode ocorrer por meio da família de transportadores de nucleosídeos equilibrativos alternativa SLC29 (ENT1, 2, 3 e 4 em mamíferos; sete homólogos nos vermes, ent-1 a ent-7) (HOBERT, 2018).

Acredita-se que tanto as ATPases quanto o transportador de nucleosídeos tenham amplos papéis fisiológicos e, portanto, sua existência no genoma do verme não pode ser considerada uma forte evidência do uso de ATP como neurotransmissor. A adenosina não é tradicionalmente considerada um neurotransmissor, mas demonstrou estar envolvida na modulação da atividade neuronal por meio de receptores acoplados à proteína G do tipo P1 (WEBSTER, 2001). Existe um claro ortólogo no verme dos receptores de adenosina, ador-1, que está igualmente relacionado aos receptores de adenosina do subtipo P1, A1, A2 e A3. (HOBERT, 2018).

O SSP, pode estar envolvido na longevidade do nematoide como sugerido por ARANTES *et al.* (2018), que relataram que os efeitos do extrato etanólico de guaraná na longevidade eram dependentes do *ador-1*. Esse receptor também foi necessário para os efeitos de *Ilex paraguariensis*

no metabolismo de gordura e consumo de energia nos vermes (MACHADO *et al.*, 2018). Em 2020 FERNANDEZ descreveu que o mutante *ador-1* retém menos e apresenta defeitos na postura de ovos comparado à vermes selvagens (Wild type). Também há relatos da ação da dopamina via receptor sinérgico semelhante à adenosina-dopamina D2 de *C. elegans*. (MANALO & MEDINA, 2018). A ação neuromoduladora ainda inexplorada dos componentes da sinalização purinérgica como: transportadores vesiculares e de recaptção, canais bloqueados por ligantes órfãos e GPCRs sugerem fortemente que tal sistema ainda não caracterizado existe no verme. Bem como, há pesquisas que sugerem alvos moleculares comuns da participação do SSP com a cafeína, dopamina, guaraná e erva mate, mas, ainda é pouco esclarecido os efeitos da adenosina sob o nematoide relacionando a fisiologia, resistência sob condições de estresse e suas defesas antioxidantes.

1.4 Estresse oxidativo e vias de defesas antioxidantes

O oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons pelos organismos aeróbicos, porque permite elevada produção de energia na respiração devido ao seu alto potencial eletroquímico. Entretanto, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres de forma que as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão constantemente presentes nas células eucarióticas (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Noventa por cento do oxigênio que entra na célula dos mamíferos é destinado à produção de energia; a mitocôndria é a grande responsável por essa produção, gerando 80% do ATP que a célula precisa (FRIEDMAN, 2011). A reação de geração de ATP inclui a transferência de elétrons aos pares para a molécula de O₂. Porém, em 1-5 % dos casos a transferência acontece apenas parcialmente, a molécula gerada permanece com apenas um elétron na última camada o que lhe confere grande reatividade; são as EROs (HALLIWELL, 2006; SIES, 1986). As moléculas que apresentam um elétron desemparelhado na camada de valência são chamadas de radicais, e por serem capazes de existir independentemente são conhecidas por radicais livres. A terminologia ERO abrange também moléculas bastante reativas, mas que não apresentam um elétron desemparelhado e, portanto, não são radicais, mas são consideradas EROs pela sua instabilidade (KOHEN & NYSKA, 2002). Os radicais que compõem o primeiro grupo de EROs são O₂-• e O-• ou nas suas formas protonadas HO₂-• e HO-•, RO•, ROO• e OH• o grupo de não radicais é formado por H₂O₂, ROOH, HOCl, O₃, HCOR, e O₂- (KOHEN & NYSKA, 2002; SIES, 1986). Existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), com radical NO• e não-radical ONOOH que se comportam da mesma forma que as EROs (KOHEN & NYSKA, 2002).

A natureza reativa das EROs e ERNs lhes garante, em sua maioria, uma meia vida extremamente curta, pois reagem rapidamente com outras moléculas doando ou recebendo elétrons para obter estabilidade (KOHEN & NYSKA, 2002). É importante lembrar que as EROs desempenham importante papel biológico participando da fagocitose na resposta imune e na sinalização intracelular, assim, organismos aeróbios adaptaram-se ao longo do tempo a um delicado equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a neutralização delas pelas defesas antioxidantes (D'AUTRÉAUX & TOLEDANO, 2007; HALLIWELL, 2006).

O termo estresse oxidativo se refere a um desequilíbrio entre a produção de (EROs) e as defesas antioxidantes. Sies em 1991 o definiu como “um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante - antioxidante em favor do anterior, levando a danos potenciais”. Matthew Whiteman e Hariwell definiram o dano oxidativo como “o dano biomolecular causado pelo ataque de EROs aos constituintes dos organismos vivos” (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Níveis aumentados de dano oxidativo podem resultar não apenas de estresse oxidativo, mas também de falha de reparo ou sistemas de substituição, e um aumento nos níveis de "biomarcadores" de dano oxidativo nem sempre implica em um nível maior de estresse oxidativo. Um antioxidante pode ser descrito como "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, retarde ou previna significativamente a oxidação desse substrato" (HALLIWELL, 2004; 2007).

É possível que o crescimento observado na divisão repetida de células cultivadas no ambiente pró-oxidante da cultura celular, ao longo de muitas gerações leve à evolução para usar EROs. Esse uso pode ser para vias de sinalização que promovem a proliferação e supressão da morte celular por mecanismos que normalmente não podem operar *in vivo* (HARRIWELL 1996; 2007). Dessa forma, o estresse oxidativo nem sempre é ruim: a formação de EROs em locais de inflamação pode não apenas destruir os patógenos invasores, mas também ajudar a modular uma resposta inflamatória exuberante em certas circunstâncias. Este é um dos muitos paradoxos no campo dos radicais livres / antioxidantes ora podem causar dano ora podem contribuir para respostas positivas ao metabolismo (HALLIWELL, 2006;2007).

C. elegans geneticamente uniforme mantido em condições laboratoriais semelhantes, mostra uma notável aleatoriedade no envelhecimento e na morte, e as manipulações genéticas que aumentam a longevidade parecem agir, em parte, aumentando os níveis de defesa antioxidante (HERNDON *et al.*, 2002 ; MURPHY *et al.*, 2003). Uma vez que a hierarquia da capacidade antioxidante depende em grande parte da metodologia de ensaio usada - mudando o método a capacidade antioxidante de qualquer composto é diferente. Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo*, por exemplo, glutatona (GSH) e superóxido dismutases, ou retirados da dieta.

(HALLIWELL, 2007).

Estudos recentes, descrevem o efeito protetor da adenosina contra o estresse oxidativo induzido pelo paraquat (XIE & CHEN, 2020) mas, ainda é necessário esclarecer como tal molécula participa da modulação de proteínas e fatores de transcrição responsáveis pela defesa do nematoide.

1.5 Resistência ao estresse em *C. elegans*

C. elegans é um bom modelo para estudar a capacidade antioxidante de substâncias *in vivo*, pois o estresse oxidativo pode ser induzido a partir da exposição a oxidantes ou por mudanças de temperatura (WILSON *et al.*, 2006). A sobrevivência após a exposição a um composto gerador de ROS (oxidante), como paraquat ou juglone, é uma maneira para avaliar as vias do nematóide relacionadas a resistência ao estresse. Juglone é uma quinona redox-ativa, quando absorvida pelas células e reduzido com NAD(P)H pelas flavoenzimas, a juglone pode reduzir O_2 a $O_2^{\bullet -}$ (ânion superóxido), exercendo assim toxicidade dependente de oxigênio. *C. elegans* é mais permeável à juglone do que outros agentes como o paraquat e contém atividade redutase capaz de usar NADH ou NADPH para redução de juglone, sendo muito tóxico para o verme, mas mais estável que H_2O_2 e mais tóxico que paraquat. Portanto, essa quinona representa uma forma ideal de aumentar as concentrações internas de ROS (SENCHUK, 2017).

O estresse por calor é um importante desafio ambiental que representa a reação dos animais a ambientes de alta temperatura e alta umidade e, além disso, produz consequências desfavoráveis que vão do desconforto à morte (SELYE, 1976). Sob estresse por calor, o nível de ROS em animais também aumenta. Consequentemente, o corpo entra em um estado de estresse oxidativo e começa a produzir e liberar proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein - HSP). É importante entender como os organismos se defendem contra esses danos em nível sistêmico e como os fatores de transcrição promovem a resistência aos radicais livres em organismos menos complexos, como vermes, moscas e roedores (CYPSEY *et al.*, 2013; NAHABEDIAN *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2004; COOPER *et al.*, 2015).

Os eucariotos se defendem contra compostos tóxicos ou reativos por meio de um sistema de desintoxicação trifásico. Podemos encontrar o SSP participando da fase 3, neste processo as toxinas conjugadas são bombeadas para fora da célula por um cassete de ligação de ATP (ABC) ou outros carreadores. (SELYE, 1976; AHMAD & SUZUKI, 2019)

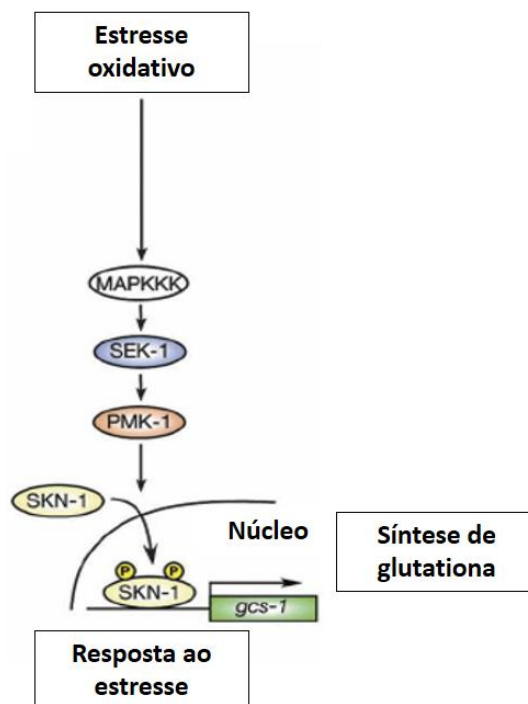
1.6 Fatores de transcrição

Uma via de sinalização importante de estresse oxidativo é a sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (Figura 4). Em *C. elegans* esta via regula a resposta ao estresse oxidativo através da ativação de SEK-1, PMK-1 e posteriormente do fator de transcrição SKN-1. Em mamíferos, muitos genes de fase 2 são induzidos diretamente pelas proteínas Nrf1 e Nrf2 (fator relacionado ao NF-E2) (LITHGOW & WALKER, 2002; KENYON, 2005).

As proteínas Nrf são predominantemente citoplasmáticas, mas em resposta ao estresse, elas se acumulam nos núcleos e regulam positivamente a expressão dos genes da fase 2, que são amplamente conservados (ITOH *et al.*, 1999; INOUE *et al.*, 2005)

A função somática proposta do SKN-1 (ortólogo Nrf) em *C. elegans* é regular um banco de genes, possivelmente todos intestinais, que estão envolvidos na desintoxicação de fase 2 e que fornecem proteção contra ROS e outras toxinas ambientais. Um exemplo de tal gene é o *gcs-1*, que codifica a enzima glutamilsteína sintase envolvida na produção de glutatona. Além disso, os mutantes *skn-1* são altamente sensíveis ao estresse oxidativo (TULLET *et al.*, 2008; XU & LI, 2005).

Figura 4. A via MAPK regula a resposta ao estresse oxidativo através do fator de transcrição CNC SKN-1. Em resposta a estresse oxidativo, PMK-1 fosforila SKN-1, levando ao seu acúmulo no núcleo do intestino, onde SKN-1 ativa a transcrição de *gcs-1*, um gene da enzima de desintoxicação de fase II.



Fonte: Inoue, Hideki, et al. "The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response." *Genes & development* 19.19 (2005): 2278-2283.

SKN-1 se acumula nos núcleos intestinais em resposta ao estresse e é inibido de fazer isso constitutivamente por mecanismos que incluem fosforilação por glicogênio sintase quinase-3 e a via de sinalização semelhante à insulina/IGF-1 conservado (IIS) (JASPER, 2008; COOPER *et al.*, 2015.). Em *C. elegans*, IIS a jusante das quinases AKT-1/2 e SGK-1 fosforilam e inibem SKN-1 em paralelo ao fator de transcrição FOXO DAF-16 (COOPER *et al.*, 2019) o principal regulador da transcrição de genes envolvidos em vários processos biológicos, incluindo resistência ao estresse (AN & BLACKWELL, 2003; AN *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2005; MURPHY, *et al.*, 2003; KENYON & MURPHY, 2006; OH *et al.*, 2006). A família de genes forkhead box (Fox) codifica fatores de transcrição caracterizados por um domínio de ligação ao DNA de “hélice alada” (forkhead box) e é evolutivamente conservada em espécies que variam de levedura a humanos (WEIGEL *et al.*, 1989; HANNENHALLI, & KAESTNER, 2009). Esses fatores de transcrição têm papéis regulatórios em uma infinidade de processos celulares, como diferenciação, apoptose, reparo de DNA, parada do ciclo celular, metabolismo, estresse, resposta imune e longevidade (ACCILI & ARDEN, 2004; GREER & BRUNET, 2005; HUANG & TINDALL, 2007).

Em mamíferos, existem 19 subclasses de fatores de transcrição Fox (A a S) com base na homologia de sequência (HANNENHALLI & KAESTNER, 2009) e a subclasse FoxO contém quatro membros codificados por genes distintos: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX), e FoxO6 (HANNENHALLI & KAESTNER, 2009; KAESTNER *et al.*, 2000). Em invertebrados, apenas um membro da subfamília FoxO foi caracterizado: DAF-16 em *C. elegans* (LIN *et al.*, 1997; OGG *et al.*, 1997) e dFOXO em *Drosophila melanogaster* (KRAMER *et al.*, 2003). O genoma de *C. elegans* codifica 40 peptídeos tipo insulina (ILPs - Insulin-like peptides) que são amplamente expressas em neurônios e interneurônios (PIERCE *et al.*, 2001; CORNILS *et al.*, 2011; KODAMA *et al.*, 2006). Em notável contraste com o número de ILPs, há apenas um receptor de insulina (IR) em *C. elegans* - DAF-2. Em humanos, por outro lado, existem vários receptores de tirosina quinase (IR, IGF-IR, IGF-IIR e um receptor híbrido relacionado ao receptor de insulina - IRR) que se ligam à insulina, IGF-1 e IGF-2 com diferentes afinidades para provocar diversos e complexos efeitos fisiológicos (CLAYTON *et al.*, 2011).

Em *C. elegans*, cinco isoformas DAF-16 diferentes são transcritas a partir de três promotores distintos de um único locus genético: *daf-16a1 / a2*, *daf-16b* e *daf-16d / f* (LEE, *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2010; BANSAL *et al.*, 2014). Essas isoformas diferem em sua distribuição e função nos tecidos, conforme indicado por vários estudos usando repórteres transcricionais e translacionais, troca de promotor, mutantes e RNA de interferência

(RNAi) (LEE, *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2010; CHRISTENSEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015). A via de sinalização da insulina / IGF-1 é uma cascata de fosforilação conservada evolutivamente que controla o crescimento, o metabolismo e a reprodução em resposta à disponibilidade de nutrientes em todos os eucariotos (Figura 5). Além disso, essa via tem um papel bem estabelecido na regulação do envelhecimento em *C. elegans* (KENYON, *et al.* 1993; FRIEDMAN & JOHNSON, 1988). Após a ligação do ligante semelhante à insulina, o receptor de *C. elegans* DAF-2 se autofosforila, o que resulta no recrutamento e ativação da subunidade catalítica p110 de PI3K / AGE-1 (MORRIS *et al.*, 1996). AGE-1 catalisa a conversão de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3) (WEINKOVE *et al.*, 2006).

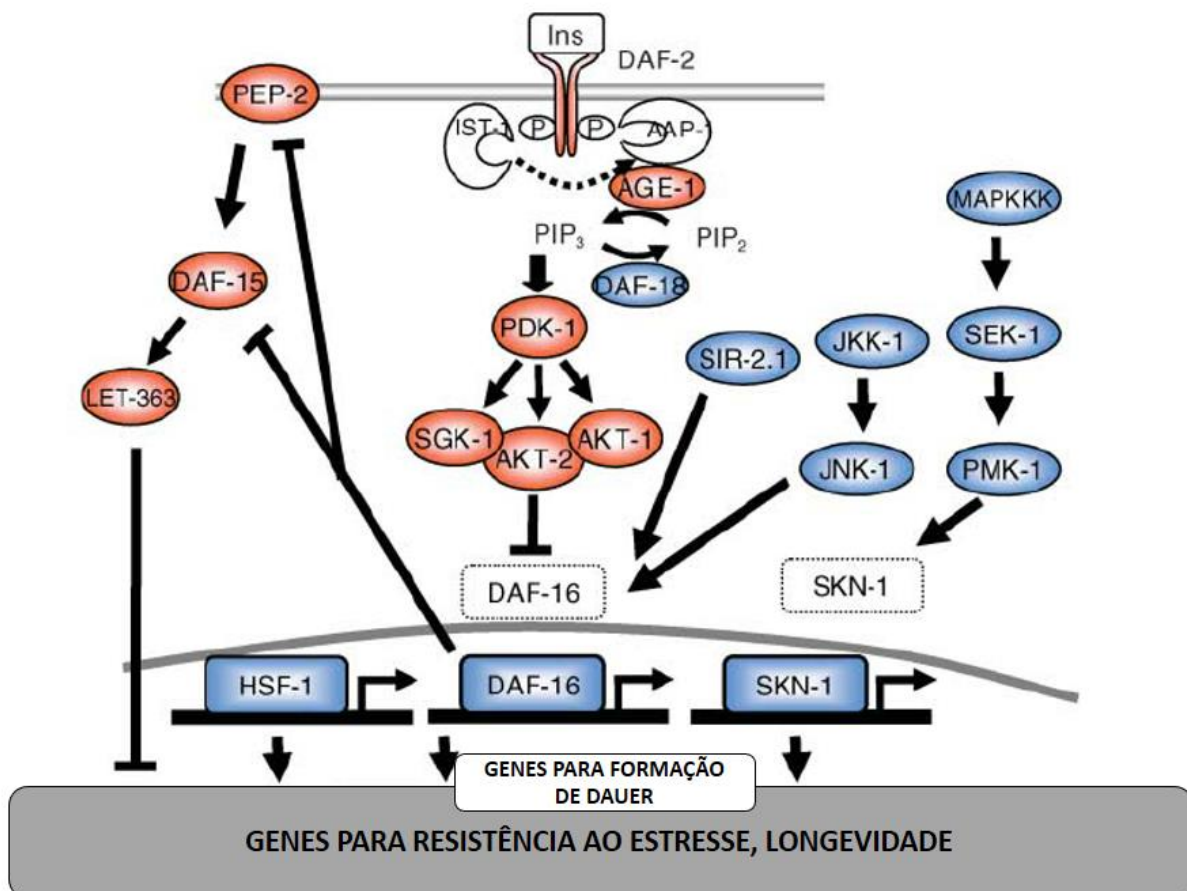
Em humanos, a subunidade catalítica p110 é recrutada para a membrana por subunidades do adaptador PI3K que se ligam às fosfotirosinas das proteínas-esqueleto do substrato do receptor de insulina (IRS) (TANIGUCHI *et al.*, 2006) O genoma de *C. elegans* codifica os homólogos da unidade adaptadora IRS e PI3K, *ist-1* e *aap-1*, respectivamente (WOLKOW *et al.*, 2002). Níveis elevados de PIP3 resultam na ativação do homólogo de quinase-1 dependente de 3-fosfoinosítido PDK-1 (PARADIS *et al.*, 1998; 1999) que, por sua vez, fosforila e ativa os homólogos Akt / PKB AKT-1 e AKT-2 e quinase induzível por glicocorticóides SGK-1 (HERTWECK *et al.*, 2004). Em mamíferos, tanto AKT quanto SGK podem inibir FoxO3A por fosforilação, mas diferem na preferência por locais regulatórios. Em *C. elegans*, o papel regulador do SGK-1 é menos claro.

Enquanto SGK-1 fosforila DAF-16 *in vitro*, (HERTWECK *et al.*, 2004; BRUNET, *et al.*, 1999; 2001) não influencia a localização subcelular de DAF-16 *in vivo*, mas provavelmente exerce sua função reguladora ao afetar outras proteínas que interagem com DAF-16 (ASHRAFI *et al.*, 2013). A fosforilação de DAF-16 por AKT-1 e AKT-2 promove seu sequestro no citoplasma por meio da associação com proteínas 14-3-3 PAR-5 e FTT-2 (Berdichevsky *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Em condições onde o IIS está reduzido devido a estresse ou mutações em *daf-2* ou qualquer uma das quinases da via, DAF-16 transloca para o núcleo onde modula a transcrição de seus alvos (MURPHY *et al.*, 2003; SCHUSTER *et al.*, 2010; WANG & KIM, 2003; EVANS *et al.*, 2008).

Para cumprir suas diversas funções, o DAF-16 integra sinais de várias vias acima dele que atuam em paralelo ao IIS c-Jun N-terminal quinase (JNK-1 - membro da família MAPK), e CST-1, um homólogo de Ste20-like quinase 1 (MST1), fosforila diretamente DAF-16, levando à sua translocação nuclear e ativação em resposta ao calor e estresse oxidativo (OH *et al.*, 2005; LEHTINEN *et al.*, 2006). Outra quinase que ativa DAF-16 via fosforilação direta é a proteína

quinase ativada por AMP (AMPK) (GREER *et al.*, 2007). AMPK demonstrou fosforilar DAF-16 *in vitro* em pelo menos seis resíduos diferentes, mas não aumenta sua translocação nuclear. Por sua vez, o DAF-16 é um ativador transcricional direto de *aakg-4*, que codifica a subunidade γ reguladora da AMPK, sugerindo assim a existência de um loop de feedback positivo que ativa ainda mais DAF-16 e a expressão de seus genes-alvo. A via de sinalização do alvo sensor de nutrientes da rapamicina (TOR) também converge em DAF-16. Mais especificamente, a inibição genética de TORC1 leva ao aumento da transcrição de *daf-16* e à translocação nuclear de uma única isoforma DAF-16, DAF-16d / f, resultando em extensão do tempo de vida. Além de DAF-16, este fenótipo de longevidade também requer ativação de SKN-1 (GREER *et al.*, 2007; TULLET *et al.*, 2014; ROBIDA *et al.*, 2012).

Figura. 5 Modelo das vias de sinalização DAF-2 insulina / IGF e seus moduladores. Mutantes de perda de função dos genes indicados que aumentam a resistência ao estresse e tempo de vida (longevidade) são mostrados em vermelho, enquanto os mutantes de perda de função que diminuem a tolerância ao estresse e tempo de vida são mostrados em azul.



Fonte: Baumeister, R., Schaffitzel, E., & Hertweck, M. (2006). Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls the stress response and longevity. *Journal of endocrinology*, 190 (2), 191-202. (Adaptado e traduzido)

Concordando com essa ideia, vários estudos demonstraram a regulação positiva de superóxido dismutases (SODs), catalases e glutathione S-transferases em mutantes de IIS de vida longa (MURPHY, 2003; OH *et al.*, 2006; VANFLETEREN 1993, LARSEN, 1993. HOUTHOOFD, *et al.*, 2005). No entanto, a exclusão dupla de sod-2 e sod-3 (mitocondrial) e sod-1 e sod-5 (citosólico) tornam os mutantes IIS sensíveis ao estresse oxidativo, mas não anula sua longevidade (HOUTHOOFD, 2005; DOONAN *et al.*, 2008; HONDA, *et al.*, 2008).

Assim como o HSF-1, o DAF-16 ativa a expressão de chaperonas, entre elas o grupo de proteínas de choque térmico (hsp's) que desempenham papéis vitais na resistência ao estresse (MORIMOTO, 1998) e na manutenção da proteostase (HARTLET *et al.*, 2011). Considerando a importância de *C. elegans* como modelo em estudos de biologia e biomedicina, a caracterização do SSP em vermes é um tópico importante para investigação. O presente trabalho foi projetado para avaliar o efeito da adenosina na fisiologia, comportamento e parâmetros bioquímicos dos vermes. Duas formas de tratamento com adenosina foram realizadas para observar efeitos de curto e longo prazo na morfologia, reprodução, comportamento alimentar, comportamento locomotor, sobrevivência, produção de ROS e modulação das vias de resposta ao estresse.

2 JUSTIFICATIVA

O sistema purinérgico é uma via de sinalização primitiva descrita em algas, invertebrados e vertebrados, e está presente em todos os tipos de tecidos e células. A adenosina é uma purina, que pode desencadear processos metabólicos dependendo do receptor e da concentração que se dispõe no meio extracelular. Sabe-se que o nematoide *Caenorhabditis elegans* possui enzimas ectonucleotidasas que resumidamente são responsáveis pela metabolização de ATP em adenosina, além de que outros componentes da sinalização purinérgica já foram encontrados no verme. Também são conhecidos os efeitos de xantinas e metilxantinas como a cafeína, guaraná e erva mate, porém há escassez de estudos descrevendo a sinalização purinérgica sob a fisiologia, comportamentos, fatores de transcrição e proteínas reguladoras do estresse oxidativo em *C. elegans*. Com o intuito de preencher tais lacunas faz-se necessário tal estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Testar os efeitos do tratamento agudo ou crônico da adenosina no comportamento e morfologia dos nematoides, bem como as vias relacionadas à resposta ao estresse oxidativo e sobrevivência pós condições de estresse induzido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a exposição à adenosina (1, 5 e 10 mM) apresenta toxicidade através da análise de comportamentos básicos do verme como alimentação, defecação, locomoção e nos comportamentos reprodutivos de ovoposição e ovoprodução;
- Mensurar o efeito do pré-tratamento com adenosina em condições de estresse induzido (químico ou térmico) sobre a sobrevivência;
- Avaliar os efeitos da adenosina sobre a formação de EROs em condições de estresse induzido;
- Determinar os efeitos da adenosina sobre a ativação de vias e enzimas de resposta ao estresse (DAF-16, SKN-1, GCS-1 e HSP 16.2).

4 MANUSCRITO

RESEARCH ARTICLE

Treatment with exogenous adenosine modulates behaviors and stress response in *Caenorhabditis elegans*

Thayanara Cruz da Silva¹, Tássia Limana da Silveira¹, Luiza Venturinni dos Santos¹, Leticia Priscilla Arantes², Rodrigo Martins¹, Felix Alexandre Antunes Soares^{1*}, Cristiane Lenz Dalla Corte^{1*}.

¹Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil

CORRESPONDING AUTHORS:

Félix A. A. Soares

E-mail: felix@ufsm.br

Cristiane L. Dalla Corte

E-mail: cristiane.corte@ufsm.br

Abstract

Adenosine is a purine nucleoside that has functions in all invertebrate and vertebrate systems, and many researchers relate its use to neuromodulatory action. *Caenorhabditis elegans* is a free-living nematode found in soil, used in biological research for its advantages as an alternative experimental model. Since there is little evidence of direct actions by adenosine and the participation of the Purinergic Signaling System (SSP) in this animal, such an investigation is necessary. This research aims to test the effects of adenosine on nematode behaviors, morphology as well as on pathways related to the response to oxidative stress and survival after stress conditions. We analyzed the acute treatment with the concentrations of 1, 5 and 10 mM of adenosine in the pharyngeal musculature, defecation rhythm, locomotor behavior, and survival under stress conditions (induced by juglone or heat), SOD-3 levels and the location of the DAF-16 transcription factor (FOXO orthologous in mammals). In addition, a chronic treatment with adenosine was carried out in which we evaluated behavior, morphology, location of the DAF-16 and the levels of SKN-1, *gsc-1* and Hsp16.2, by quantifying the fluorescence of the GFP reporter protein. Adenosine did not alter the morphology analyzed by the length, width

and area of the worms, not interfere with reproductive behavior. On the other hand, adenosine modulates the defecation rate, pharynx pumping rate and locomotion, in addition to interact with stress response pathways in *C. elegans*. Together, these results contribute to the understanding of the physiological activity of adenosine in this nematode.

Keywords: adenosine, purinergic system, *Caenorhabditis elegans*, oxidative stress, behavior.

1. Introduction

The purinergic signaling system (PSS), which uses ATP, related nucleotides and adenosine as the transmission molecules, emerged very early in evolution. ATP release mechanisms and degradation enzymes act on bacteria, and the first specific receptors for these molecules appeared in protozoa and eukaryotic unicellular algae (1). The PSS nucleotides and adenosine, are generated by the hydrolysis of ATP and released in the extracellular space by ectonucleotidase enzymes (2). Adenosine is a ubiquitous molecule involved in many important cellular processes, such as metabolism and cellular energy (3). Adenosine acts as a local and homeostatic modulator in all eukaryotic cells and as a neuromodulator to control the flow of information through neuronal circuits, is a strong inducer of sleep (1, 4, 5).

The concept of adenosine receptors as P1 purinoreceptors was reported by Burnstock et al. (1978). Through four different adenosine receptors A1, A2A, A2B and A3 (6,7), adenosine may influence various bodily functions (8). A1 receptors are time and dose dependent (9) and sensitive to phosphoinositol-3-kinase inhibitors (10). Activation of A2A receptors increases MAPK activity, activation of A2 receptors inhibits endothelium adhesion and reduces the generation of reactive oxygen species (11-13). A2B receptor can regulate proliferation and differentiation in vascular smooth muscle cells (14) and the receptor A3 is insensitive to several xanthines and mediates activation of K⁺, Ca²⁺ and C phospholipases channels (7).

Recent studies in *Caenorhabditis elegans*, a free-living nematode, described the protective effect of adenosine against oxidative stress induced by paraquat (15). Previous studies have also indicated that PSS may be involved in the longevity of *C. elegans* (16,17). Arantes et al. (18) reported that the effects of guarana ethanolic extract on longevity were dependent on *ador-1*, a gene that encodes an adenosine receptor in *C. elegans*. ADOR-1 was also implicated in the effects of *Ilex paraguariensis* on fat metabolism and energy consumption in worms (17). Additionally, caffeine was demonstrated to protect DA neurons from dopamine-induced neurodegeneration by modulating adenosine receptor-DOP2R (dopamine D2-like receptor) interactions in *C. elegans* (19). These studies suggest that PSS is a common molecular target

for caffeine, dopamine and xanthenes in the nematode. Despite these studies indicating a role of adenosine in *C. elegans* physiology, PSS is poorly characterized in nematodes and its function is not clear (1).

C. elegans in the adult larval stage measures 1 mm in length, has a short life cycle and a high reproductive rate (20). It is recognized as one of the most elegant models for its particularities, including its easy genetic manipulation, semitransparent cuticle which enables microscopy techniques with mutants that express fluorescent proteins, assisting in the mapping of signaling pathway and neurotransmitter functions, often similar to those of mammals (21,22,23,24). In *C. elegans*, the insulin-like signaling pathway regulates phenotypes related to the *dauer* larva and the stress response, and it is possible to observe and classify the nuclear location of its target transcription factor, DAF-16 / FOXO (25). DAF-16 factor activates transcription of *skn-1*, *hsp 16.2*, *sod-3* and *gcs-1* genes which are known to be involved in oxidative stress, metabolism and the development of this nematode (26,27).

Considering the importance of *C. elegans* as a model in biology and biomedicine studies, the characterization of the PSS in worms is an important topic for investigation. The present work was designed to evaluate adenosine's effect in worms' physiology, behavior and biochemical parameters. Acute and chronic treatments with adenosine were performed to observe short and long-term effects on morphology, reproduction, feed behavior, locomotor behavior, survival, ROS production and modulation of stress response pathways.

2. Materials and methods

2.1. Strains and culture conditions

C. elegans N2 (**Bristol**) strain was used as wild-type. The mutant strains used in this study were: **TJ 356** transgenic (zIs356 [daf-16p :: daf-16a / b :: GFP + rol-6 (su1006)], **CL 2070** *dvIs70* [hsp-16.2p :: GFP + rol -6 (su1006)], **CF 1553** *mulS84* [(pAD76) sod-3p :: GFP + rol-6 (su1006)], **LD-1** *ldIs7* [skn-1b / c :: GFP + rol-6 (su1006)], **LD1171** *ldIs3* [gcs-1p :: GFP + rol-6 (su1006)].

All strains were obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). Worms at adult stage with eggs were synchronized with a bleaching solution (1% NaOCl, 0.25 M NaOH), and then the eggs were maintained in a plate with M9 buffer (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl and 1 mM MgSO₄). Twelve hours after this procedure, it was possible to visualize larvae in the first larval stage (L1), which were transferred to plates containing nematode culture medium (NGM: 1.7% agar, 2.5 mg/mL peptone, 25 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄ pH 6.0, 5 g/ml cholesterol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄)

with *Escherichia coli* OP50 as a food source. The worms were allowed to grow at 20 °C and all experiments were performed at this same temperature unless otherwise stated.

2.2 Treatment

2.2.1. Acute Treatment

L1 stage larvae were transferred to plates containing NGM and *E. coli* OP50. When the worms reached the young adult stage (after 38 hours), they were transferred to microtubes and exposed to 1 mM, 5 mM or 10 mM adenosine diluted in M9 buffer for 1 hour. Then, the worms were washed three times with the M9 buffer and transferred to plates containing NGM and *E. coli*. After 1h, the pharyngeal pumping rate (eating behavior), defecation rate, length, width, area, locomotor behavior, image microscopy for localization of the DAF-16 transcription factor, quantification of mitochondrial SOD-3 fluorescence were analyzed survival to chemical and thermal induction of stress and ROS analysis. After 24 hours, when the worms were in the adult stage with eggs, the reproductive behavior was evaluated through the laying and hatching of larvae. The experiments were performed in duplicate and repeated three times.

2.2.2. Chronic treatment

Worms at L1 stage were transferred to plates containing adenosine diluted in NGM to final concentrations of 1 mM, 5 mM or 10 mM containing *E. coli* OP50 as a food source, and remained until they reached the young adult stage L4. The pharyngeal pumping rate, defecation cycle, length, width, area, locomotor behavior, microscopic images for localization of the DAF-16 transcription factor, quantification of fluorescence of SKN-1, *gsc-1* factors were analyzed, HSP16.2. After 24 hours, when the worms were already in the adult stage and with the eggs, the reproductive behavior was evaluated through the laying and hatching of the larvae. The experiments were performed in duplicate and repeated three times.

2.3 Morphological parameters and locomotor activity

After treatment with adenosine, worms were washed three times with M9 buffer and acclimated for 30 minutes on plates containing NGM plus *E. coli* OP50. Afterwards, worms were transferred to plates with fresh NGM without food, after 1 minute in this medium they were recorded with MOTICAM SERIES DIGITAL MICROSCOPY 2MP camera (optical 1/3, active pixels 1600x1200, pixel size 3.2 um x 3.2 um, imaging area 5.12 mm x 3.84 mm) and the locomotor and morphological parameters we filmed and calculated its movement through the parameters using WormLab® Software MBF Bioscience, Williston, VT, USA, that minimizes experimental errors and provides a satisfactory quantitative analysis of behaviors associated

with the muscular/locomotor system of *C. elegans* (28,29).

2.4 Reproductive behavior

2.4.1 Egg laying

Twenty Hermaphrodite adult worms with eggs in the uterus were transferred to NGM plates with *E. coli*, where they remained for 2 hours to lay eggs, and were then removed. The next day, the progeny number was counted under an optical microscope as a measure of eggs laid by worm (30)

2.4.2 Egg production

Egg production was analyzed by counting the number of eggs inside the uterus of 20 worms, after the cuticle rupture with the addition of a drop of bleaching solution, quantified under an optical microscope (30).

2.5 Pharynx pumping

Pharynx contractions of 20 worms maintained on NGM plates with *E. coli* were counted with optical microscopy. The number of contractions was recorded in 10 seconds in triplicate and the average used for statistics. (30).

2.6 Defecation rate

The defecation cycle of 20 worms kept in NGM plates containing *E. coli* were analyzed under light microscopy. Worms were monitored and the interval between defecations was recorded. The average of three defecation cycles for each animal was used as an indirect measure of intestinal traffic (30).

2.7 Survival analysis test after thermal and chemical stress

2.7.1 Thermal stress

After the acute treatment with adenosine, the N2 worms were kept in plates containing NGM and *E. coli* and incubated at 35 °C for 4 hours to induce thermal stress. The worms in the negative groups were incubated at 20 °C. Survival was assessed 24 hours after the end of the experiment exposure (31). Mortality can be detected by the loss of movement of the animal, even after the stimulus and by the absence of pharyngeal beats (32).

2.7.2 Chemical stress

After acute treatment with adenosine worms were exposed for 1 hour in the M9 buffer to 200 µM of Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone), an ROS generator. After three washes in M9 buffer, worms were transferred to NGM plates with *E. coli*, and survival was examined 24 hours

after the exposure (33).

2.8 ROS production

After acute treatment with adenosine worms were exposed for 1 hour in the M9 buffer to 200 μ M of Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone). After three washes in M9 buffer, worms were transferred to NGM plates with *E. coli*. The generation of ROS was measured *in vivo* in wild type *C. elegans* using the fluorescent probe CM-H2DCFDA, as described by Zamberlan et al. (33) with minor modifications. Briefly, worms were treated with juglone (200 μ M and/ or adenosine 1, 5, 10 mM) for 1 hour, collected, washed three times with M9 buffer and transferred to 96-well plates. Then, 10 μ L of 2 mM CM-H2DCFDA (20 μ M final concentration) was added in 990 μ L M9 containing 100 worms and incubated for 2 hours. The fluorescence intensity was measured at each hour with a SpectraMax® i3x multiple mode (Molecular Devices) microplate reader (Excitation: 485 nm; Emission: 520 nm) and results were expressed as fluorescence delta per hour.

2.9 Analysis of the subcellular location of DAF-16

DAF-16 :: GFP animals TJ 356 strain (Is [daf-16P :: daf-16 :: GFP; rol-6 (su1006)]) were grown at 20 °C and photographed at the L4 stage. The worms were exposed to adenosine acutely (1h in liquid medium with M9 buffer) or chronically (exposure in NGM from stage L1 to stage L4 young adult). In order to evaluate the effect of adenosine on thermal stress, worms treated with adenosine were exposed to 20 °C (Ctrl -) or 37 °C (Ctrl+) for 1 hour in NGM plates with *E. coli*. According to Silveira et al 2018 with some modifications, the worms were mounted on slides with a 2% agarose pad and paralyzed with 10 mM sodium azide. The images were obtained using a OLYMPUS1 FLUOVIEW FV10i Confocal Microscope. The predominance of fluorescence expression in the nucleus, cytoplasm or intermediate was analyzed. Each experiment was repeated at least three times and 20 worms per group were selected randomly in each experiment.

2.10 Quantification of SKN-1, gsc-1, HSP16.2 and SOD-3 levels

The levels of SKN-1, gsc-1, Hsp16.2, and mitochondrial SOD-3 was measured by quantifying the fluorescence of the GFP reporter protein using a OLYMPUS1 FLUOVIEW FV10i Confocal Microscope, according to Silveira et al 2018 with some modifications. Approximately 50 worms in M9 buffer were transferred to microscopic slides, paralyzed with 10 μ L of sodium azide 10 mM, and then covered with a coverslip. The fluorescence intensity of each worm was analyzed using ImageJ2X (ImageJ2X Programs; Rawak Software, Inc., Stuttgart, Germany). From each experimental group, 20 worms were chosen randomly to measure the average pixel

density. In order to evaluate the effect of adenosine on thermal stress, worms treated with adenosine were exposed to 20 °C (Ctrl -) or 37 °C (Ctrl+) for 1 hour in NGM plates with *E. coli*. Data were expressed as percentage of control group fluorescence (% AFU - arbitrary fluorescence units).

2.11 Statistic

Normality of data was assessed by Kolmogorov–Smirnov test. Parametric results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test and nonparametric results were analyzed by Kruskal Wallis. followed by Dunn’s post hoc test. Results were considered significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Adenosine does not interfere with morphological development and reproductive behavior in wild type *C. elegans*.

Neither acute nor chronic adenosine altered morphological parameters such as worm length, width and area. Reproductive behavior was measured by the rate of egg production and hatching larvae. No statistical difference was observed in these parameters after acute or chronic treatment with adenosine when compared with controls (Supplementary Figure 1)

3.2 Adenosine interferes with pharynx pumping and defecation rhythm in *C. elegans*.

Pharyngeal pumping (eating behavior) and the rate of subsequent contraction of the intestine (rate of defecation) were analyzed in *C. elegans* N2 wild type after acute and chronic treatment with adenosine. Acute adenosine at concentration of 5 mM increased the defecation rate in worms (Figure 1. B). Similarly, worms treated chronically with 10 mM of adenosine presented augmented food consumption and defecation cycle (Figure 1.C and D).

3.3 Acute and chronic adenosine affects locomotor behavior in *C. elegans*.

Acute and chronic adenosine treatment altered the locomotor behavior of *C. elegans* (Figure 2). The acute treatment with adenosine increased the track length (Figure 2.A), center point speed (figure 2.B) and absolute peristaltic track length (Figure 2.C) at concentrations of 1 and 10 mM. Adenosine at 5 mM significantly increased the straight-line distance (Figure 2.D) and mobility idle time (Figure 3.B). On the other hand, chronic treatment with adenosine decreased the behaviors of track length (Figure 2.E), center point speed (Figure 2.F), absolute peristaltic track length (Figure 2.G) straight-line distance (Figure 2.H) at concentrations of 1 and 10 mM. Additionally, chronic 10 mM adenosine decreased turn count behavior (Figure 4.D).

3.4 Adenosine does not change the survival rate of wild type worms after stress induction.

Analysis of the survival rate was observed in N2 strain at young adult stage to verify the protective effects of pre-treatment with adenosine against mortality induced by chemical stress (Figure 5.B) and thermal stress (Figure 5.A). Acute treatment with adenosine 1, 5 and 10 mM did not protect worms against mortality caused by both forms of stress.

3.5 Acute and chronic adenosine modulates DAF-16 activation in *C. elegans*.

In confocal imaging analysis, we observed the cell location of the DAF-16 IGF / FOXO transcription factor and classified the worms in 3 locations according to the distribution of the protein in the cytoplasm, nuclear or intermediate for the two cytoplasmic and nuclear situations, (figure 6 and supplementary table 1).

Thermal stress of 37 °C for 1h (+) induced activation of DAF-16 and its translocation to the nucleus (Figure 6.A). Treatment with acute or chronic 10 mM adenosine induced nuclear activation and translocation of the DAF-16 transcription factor in mutants of the TJ 356 strain. Acute treatment with 1 and 5 mM adenosine avoided the effects of thermal stress in DAF-16 translocation to the nucleus (Figure 6.B).

3.6 Chronic adenosine modulates SKN-1 and HSP 16.2 but not *gsc-1* after thermal stress in *C. elegans*.

Chronic treatment with adenosine caused an increase in SKN-1 levels (Figure 9.A) while didn't altered the levels of HSP.16.2 (Figure 9.C) and GSC-1 (Figure 9.B). Worms exposed to thermal stress presented increased levels of SKN-1 and HSP 16.2 but not *gsc-1*. However, worms treated with adenosine and submitted to thermal stress presented reduced SKN-1 and HSP 16.2 levels compared to the group submitted to thermal stress without adenosine.

3.7 Acute treatment with adenosine increases ROS production and SOD-3 levels in *C.elegans*.

ROS production was analyzed under basal conditions and stimulated by juglone, a prooxidant agent. Acute adenosine *per se* increased DCFH oxidation over time (Figure 8. A) in worms. Juglone increased DCF levels in worms and pre-treatment with adenosine could not altered DCFH oxidation-induced by juglone (Figure 8.B) The levels of SOD-3::GFP was analyzed by fluorescence microscopy in the strain CF 1553. Thermal stress induced an increase in SOD-3 levels (Figure 7). Acute adenosine at 1 and 5 mM prevented thermal stress-induced increase in levels of SOD-3. Adenosine *per se* had no effect on SOD-3 levels.

4. Discussion

Adenosine is one of the main transmitting agents along with ATP, being present in organisms, in all cells and systems. It is an important signaling mediator in mammals, and although its role has been described from the beginning of the development of eukaryotic beings, in *C. elegans* its effects are not yet fully understood (1). In this work we investigated the effects of adenosine on physiological, morphological and biochemical parameters of *C. elegans*. In this way, the worms were initially treated with adenosine 1 mM, 5 mM and 10 mM in two forms, first in an acute exposure with the adult wild type hermaphrodite worms juvenile L4, and a chronic treatment exposing the worms from the first larval stage (L1) to the young adult L4, or adult with eggs for the analysis of reproductive behavior. The morphological parameters were classified by width, length and area of the worms, and no alteration was observed in the worms that were exposed to the three adenosine concentrations (Figure 1 supplementar and 7).

C. elegans hermaphrodites are self-fertile and their rate and temporal pattern of egg laying are modulated by various environmental signals, serotonergic hermaphrodite-specific neurons (HSNs), along with the cholinergic ventral cord type C neurons (VCs) and neurotransmitters such as serotonin and acetylcholine (35, 36). There is an interaction of adenosine with egg production, the *ador-1* mutant produces fewer eggs than the wild type, and adenosine partially reverses the reduced litter size of caffeine (16, 79). In our results there is a trend in increased egg production but it was not statically significant (supplementary figure 1D,1E,1I,1J).

The pharynx is also coordinated by the nervous system. This organ is responsible for sucking bacteria from the outside into the worm, by the action of the musculature and variable pumping according to the availability of food (37) and small transmitters already mentioned plus glutamate (38,39). Franks et al. (37) and Papaioannou et al. (2005) reported a possible interaction with cholinergic signaling that regulates actions of extra-pharyngeal cholinergic neurons (37,40). In addition, ATP and adenosine were shown to inhibit ACh release from motor nerve terminals (41) and excitation of neurons via the A1 receptor, on the other hand, adenosine increases ACh excitation of neurons via the A2 receptor. Previous studies showed the stimulation promoted by the purinergic system in pharyngeal pumpings of insects (42). In our work we analyzed the pumping time of the anterior pharyngeal bulb musculature of worms and observed that the chronic treatment with adenosine induced an increase in the pharynx pumping (Figure 9 A).

Treatment with acute (Figure 1.B) and chronic (Figure 1.D) adenosine caused a significant increase in the rate of defecation of N2 worms. Previous studies have described the interaction of the purinergic system and calcium, and that the defecation rate is strongly associated with

the levels of calcium ions in the hindgut, reflecting the behavior of the inositol triphosphate receptor (ITR-1) (43). In addition, the defecation behavior in worms is coordinated by the intestinal musculature (mainly enteric) and a small number of neurons (44). We speculate that adenosine could interact with calcium channels, and that it participates in intestinal muscle coordination resulting in defecation. The nervous system works based on the subtle balance of excitatory and inhibitory signals (45). The locomotor behavior of *C. elegans* is generally achieved by the combination of four simple locomotor events, forward and backward movements, turns and omega (46), curves and reversals occur at stable frequencies but at irregular intervals, producing probabilistic exploratory behaviors (47). The escape circuit was defined in these nematodes using a synaptic wiring complete diagram of the 302 neurons in their nervous system (48,49). The reversal responses are behaviors that allow the analysis of neural and muscular functioning, behaviors such as turn count that are linked to toxicological response (50,51). The neural mapping and the motor functions already described in the model allow analyzes that link both structures.

In a gradient space of a chemoattractant, the worms advance when they are directed to the point of origin of the chemoattractant. On the other hand, when they move down the gradient, they execute the pirouette locomotor program that combines short backward movements and subsequent forward movements in another direction (52). Pirouettes are approach behaviors, to analyze chemotaxis responses. At high osmolarity, sensory sensitivity and neurotoxicity, the demonstration of these behaviors is characteristic of locomotor defects (53,54,55). Changes in locomotor behavior probably present the best opportunity for the development of broad generic test protocols in behavioral ecotoxicology (56). Acute and chronic treatment with adenosine modulates the worm's locomotor activity in different ways. We observed changes in the coordination of the movement of worms treated with adenosine 1, 5 and 10 mM, these groups in acute treatment have greater displacement and speed, and longer exploratory behavior (Figure 2 B, D) and an increase in the period of inactivity. In the analysis of locomotor behavior, adenosine in chronic treatment reduces displacement, speed and decreases the time of reversals (Figure 2.F, H). Additionally, it is possible to observe in *C. elegans* behavior, that the intermediate concentration of 5 mM of adenosine doesn't present the same effect observe in the lowest (1 mM) and highest (10 mM) concentration, which may indicate a hormetic effect of adenosine on behavior.

Survival after exposure to a ROS generating compound such as paraquat or juglone is an answer to assess the nematode's response to stress. Juglone is a redox-active quinone (58). Therefore, it represents an ideal way to increase internal concentrations of ROS. The antioxidant actions

of adenosine after *C. elegans* exposure to paraquat was proposed by Xie et al. (15). The resistance of the animals decreases with the increase in the concentration of paraquat, showing a deleterious effect on the worms, protection is observed in the intermediate and high concentrations of adenosine (300 μ M and 3000 μ M). In order to investigate the role of adenosine in modulating the stress response, worms were exposed to chemical stress by 200 μ M juglone or heat stress at high temperature 35 °C. Adenosine treatment was not effective in protecting worms from chemical and thermal stress-induced mortality (Figure 5.A and B). Likewise, acute treatment with adenosine did not protect the worms against juglone-induced ROS production (Figure 8.B) and increased ROS production *per se* (Figure 8.A).

Heat stress is an important environmental challenge representing the reaction of animals to high temperature and high humidity environments and, in addition, it produces unfavorable consequences ranging from discomfort to death (59). Under heat stress, the level of ROS in animals also increases. Consequently, the body enters a state of oxidative stress and begins to produce and release heat shock proteins. It is important to understand how organisms defend against this damage at the systemic level, and how transcription factors promote resistance to free radicals in less complex organisms such as worms, flies and rats (60,61,63).

Eukaryotes defend against toxic or reactive compounds through a three-phase detoxification system (64,65). We can find the PSS participating in phase 3, in this process the conjugated toxins are pumped out of the cell by an ATP binding cassette (ABC) or other carriers (65). In mammals, many phase 2 genes are directly induced by Nrf1 and Nrf2 proteins (factor related to NF-E2) (60,61). Nrf proteins are predominantly cytoplasmic, but in response to stress, they accumulate in the nuclei and up-regulate expression of the phase 2 genes which are largely conserved (66). The proposed somatic function of SKN-1 (ortholog Nrf) in *C. elegans* is to regulate a bank of genes, possibly all intestinal, that are involved in detoxification “phase 2” and that provide protection against ROS and other environmental toxins. An example of such a gene is *gcs-1*, which encodes the glutamylcysteine synthase enzyme involved in glutathione production. Furthermore, *skn-1* mutants are highly sensitive to oxidative stress (67-71).

SKN1 accumulates in intestinal nuclei in response to stress and is inhibited from doing so constitutively by mechanisms that include phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 and the insulin-like signaling pathway / conserved IGF-1 (IIS) (63,71). In *C. elegans* IIS downstream kinases AKT-1/2 and SGK-1 phosphorylate and inhibit SKN-1 in parallel to the transcription factor FOXO DAF-16 (63), the main transcriptional regulator of genes involved in several biological processes, including stress resistance (73-78). In *C. elegans* these Insulin/IGF-1-like signaling lowering benefits require DAF-16, and it was recently shown that

SKN-1 also contributes to these effects (63). We investigated the effect of acute and chronic adenosine on the nuclear localization of transcription factor DAF-16 as an indicator of stress, exposing the animals in two temperature trials, (20 °C) basal conditions and heat stress (37 °C). This transcription factor migrates to the cell nucleus when the organism is exposed to pro-oxidant agents (67) (Figure 6). Under heat stress, acute treatment with adenosine decreased DAF-16 activation and translocation to the nucleus. In contrast, chronic adenosine increases DAF-16 translocation to the nucleus *per se*. These results suggest that adenosine interacts with components of the DAF-16 pathway, and to test this hypothesis, we measured the activation of downstream DAF-16 genes. Acute adenosine *per se* activated SOD3 expression under baseline conditions (20°C) (Figure 7).

In our results, chronic adenosine treatment increased SKN-1 expression *per se* under basal conditions, but was unable to restore SKN-1 expression to control levels under heat stress. Chronic treatment with adenosine did not affect the expression of *gcs-1* (*gsc-1::GFP*) (Figure 9.B), under basal conditions or heat stress. The analysis levels of HSP 16.2 (Figure.9.C) was not modified by chronic treatment of adenosine under basal conditions, but had its levels partially decreased by adenosine under heat stress. These results suggest that adenosine can interact with DAF-16 and modulate the stress response caused by unfolded proteins.

Together, these results demonstrate that exogenous adenosine has physiological and biochemical effects on *C. elegans* and illuminates purinergic signaling in worms. As far as we know, there are no records in the literature of toxicological studies specifically with adenosine, only in combinations, with caffeine and other purines. Bridi *et al.*, (16) demonstrates the interference of adenosine-dependent signaling in *C. elegans* lifespan and the present study showed that adenosine activates the nuclear translocation of the DAF-16 transcription factor and modulates the expression of SKN-1 and HSP.16 proteins, in addition to show different regulation in the muscular system of *C. elegans*.

5. Conclusion

The present work contributes to the understanding of the physiological activity of adenosine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Adenosine does not alter the morphological development analyzed by the length, width and area of the worms, nor does it interfere with reproductive behavior. Adenosine reduced the defecation cycle, suggesting a possible interaction with the calcium channels present in the nematode intestine, in addition to increasing the activation of DAF-16 and the expression of fluorescence associated with the proteins of HSP 16.2 and SKN-1 expressed mainly in intestinal cells, this expression demonstrates the

activation of antioxidant defenses in the worms' organism. However, adenosine was not effective in increasing antioxidant defenses when an animal was exposed to conditions of chemical or thermal stress and evaluation under ROS. The SSP participates in the modulation of locomotor behaviors interfering in the speed and mobility of the worms analyzed, suggesting an interaction with the pharynx muscles, intestinal and motor muscles associated with neurons suggesting the participation of gabaergic and cholinergic signaling.

6. Figures

Figure 1. Behavioral analysis in young-adult larvae of the wild strain of *Caenorhabditis elegans* after acute or chronic treatment with adenosine (mM). Effects of acute treatment on (A) Pharyngeal pumping, (B) Defecation rate. Effects of chronic treatment on (C) Defecation rate, (D) Pharyngeal pumping. The results were evaluated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test, * $p < 0.05$ significant difference in the acute treatment with 5 mM adenosine compared with the control, **, *** significant difference in the chronic treatment with 10 mM adenosine compared with the control, mean SEM, $n = 20$ worms per group. The experiments were performed in triplicate.

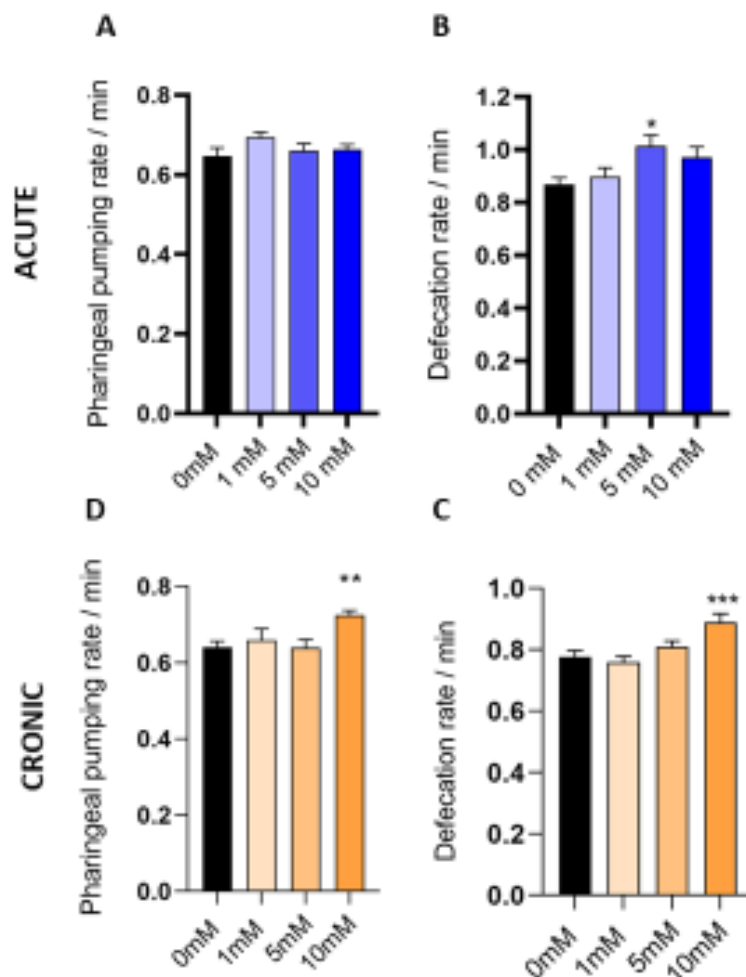


Figure 2. Locomotor system of the N2 young-adult larvae of the wild strain of *Caenorhabditis elegans* after acute or chronic treatment with adenosine (mM). The results were evaluated by One Way ANOVA or Kruskal-Wallis, *, ** significant difference in the treatment of 1, and 10 mM adenosine compared with the control, mean SEM, n = 14 - 18 worms per group. The experiments were performed in triplicate.

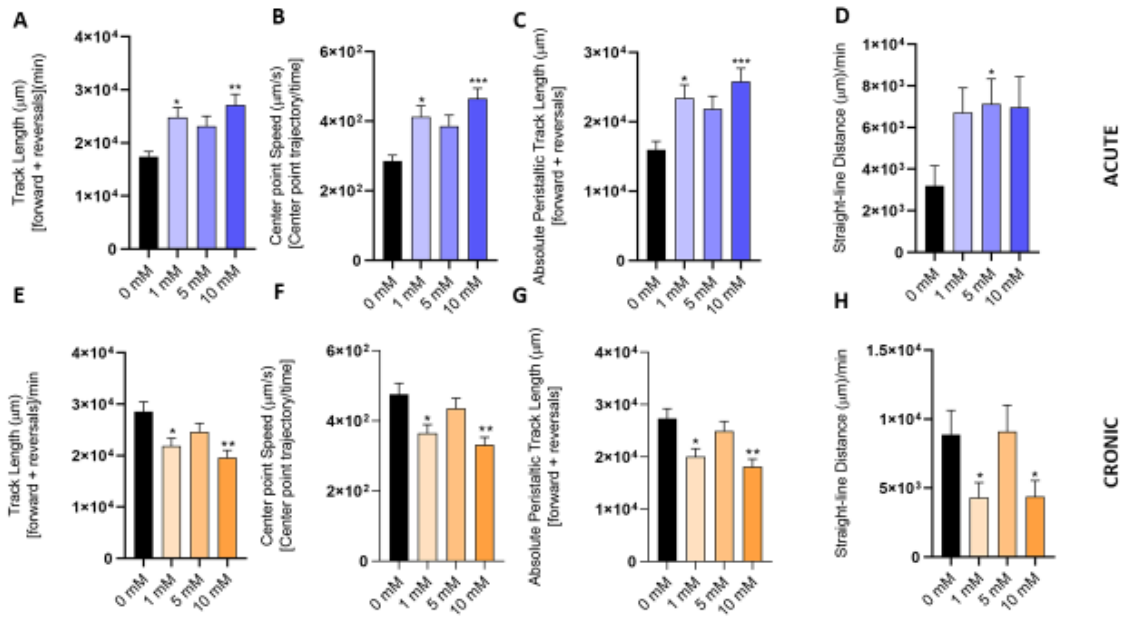


Figure 3. Mobility in young-adult larvae of the wild strain of *Caenorhabditis elegans* after acute or chronic treatment with adenosine (mM). The results were evaluated by Kruskal-Wallis Dunn's post-test, **** significant difference in the treatment of 5 mM adenosine compared with the control, mean SEM, n = 14 - 18 worms per group. The experiments were performed in triplicate.

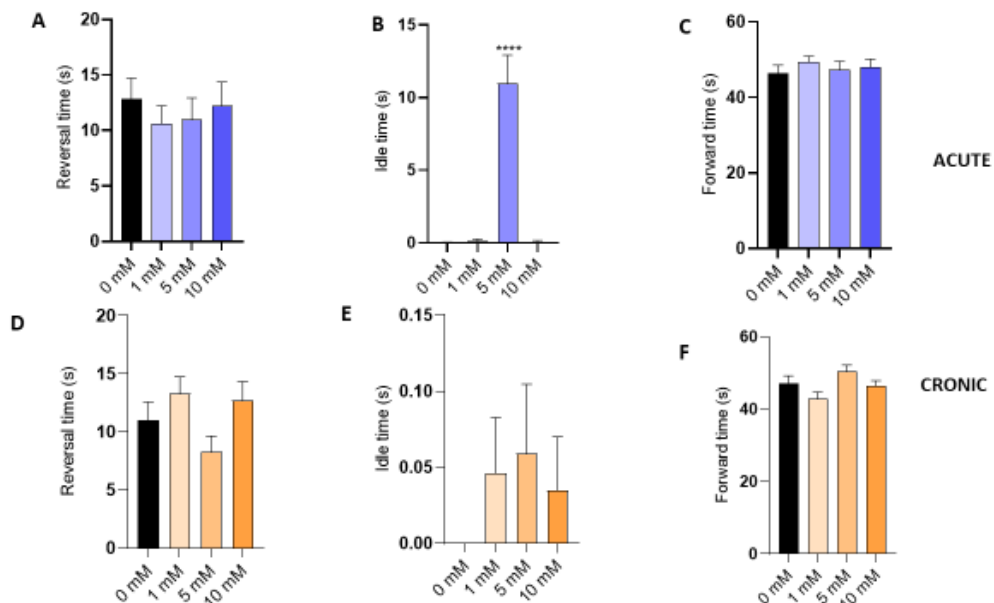


Figure 4. Neurotoxicity-related behaviors in young-adult larvae of the wild strain of *Caenorhabditis elegans* after acute or chronic treatment with adenosine (mM). The results were evaluated by Kruskal-Wallis Dunn's post-test, * significant difference in the treatment of 10 mM adenosine compared with the control, mean SEM, n = 14 – 18 worms per group. The experiments were performed in triplicate.

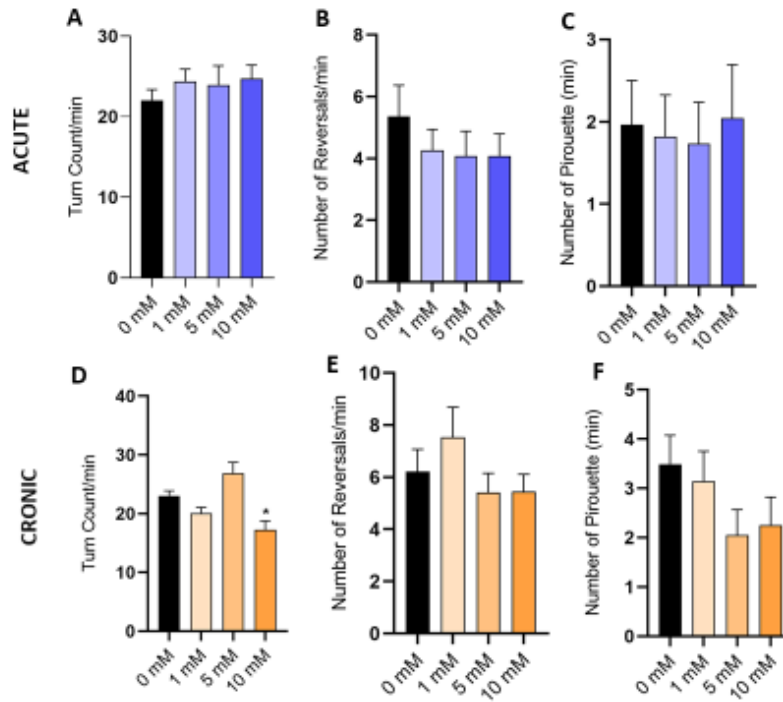


Figure 5. Effect of acute treatment with adenosine on survival rate of wild-type young adults *C. elegans*, after exposure to (A) thermal stress for 4h at 35° C (n = 400) and (B) 200 μ M Juglone for 1h, (n = 500) Data are expressed as mean \pm SEM and analyzed by Kruskal-Wallis test follow Dunn's post hoc test.. The minus sign (-) represents the groups exposed to a temperature of 20°C, the (+) sign represents the groups exposed to 35°C heat. The experiments were performed in triplicate

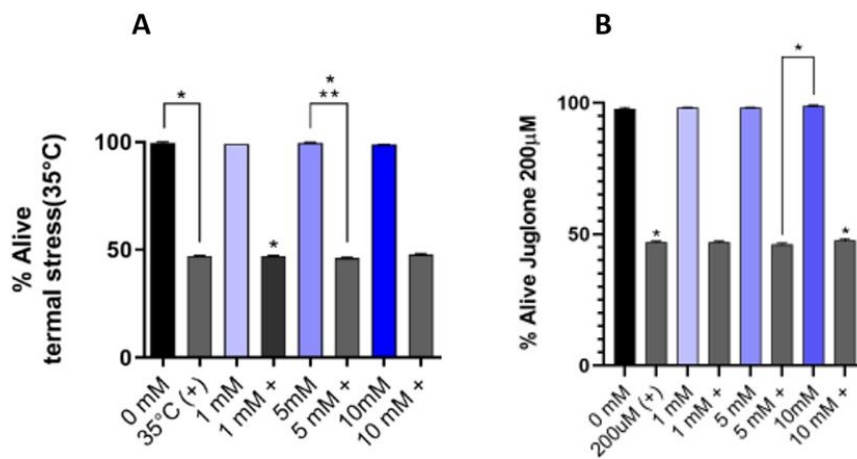


Figure 6 A. Effect of acute and chronic treatment with 10mM adenosine and thermal stress (37° C) on DAF-16 (TJ356 ::GFP) *C. elegans* transgenic strain. Data are expressed as means \pm S.E.M from three independent assays with 30 worms per group. The minus sign (-) represents the groups exposed to a temperature of 20°C, the (+) sign represents the groups exposed to heat at 37°C. **(B)** Confocal images representation location of DAF-16 transcription factor, TJ 356 mutant strain.

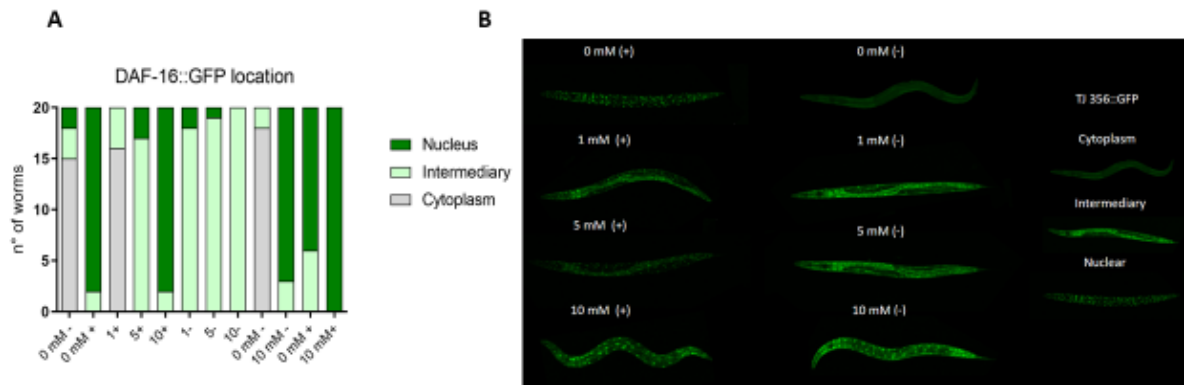


Figure 7. Arbitrary Fluorescence Units (AFU) measure in young-adult larvae of the CF1553 (SOD-3 mitochondrial::GFP) strain of *Caenorhabditis elegans* after acute treatment of 1h with adenosine (mM). The results were evaluated by One way ANOVA follow Tukey's post hoc test, difference in the treatment compared with the control, mean \pm SEM, n = 10 worms per group. The experiments were performed in triplicate. ** 0 mM (-) vs 0 mM (+); **0mM (-) vs 10mM(+); *0 mM (+) vs 1mM(-); ** 1mM(-) vs 10mM(+); *5mM(+) vs 10mM (+); The minus sign (-) represents the groups exposed to a temperature of 20°C, the (+) sign represents the groups exposed to heat at 37°C

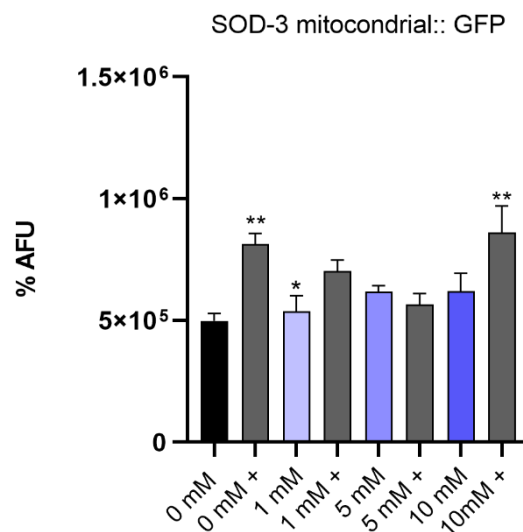


Figure 8. ROS production assay after acute treatment with adenosine (mM) in wild type young adult worms of *C. elegans*. (A) adenosine *per se*. (B) stress induction with 200 μ M Juglone. ROS labeled with the 2' 7' fluorescent probe - dichlorofluorescein diacetate expressed as delta per hour of relative fluorescence units. *Indicates statistical difference from control, $p < 0.05$ mean \pm SEM n= 1000 worms per group. The results evaluated were by T-test, experiment repeated three times.

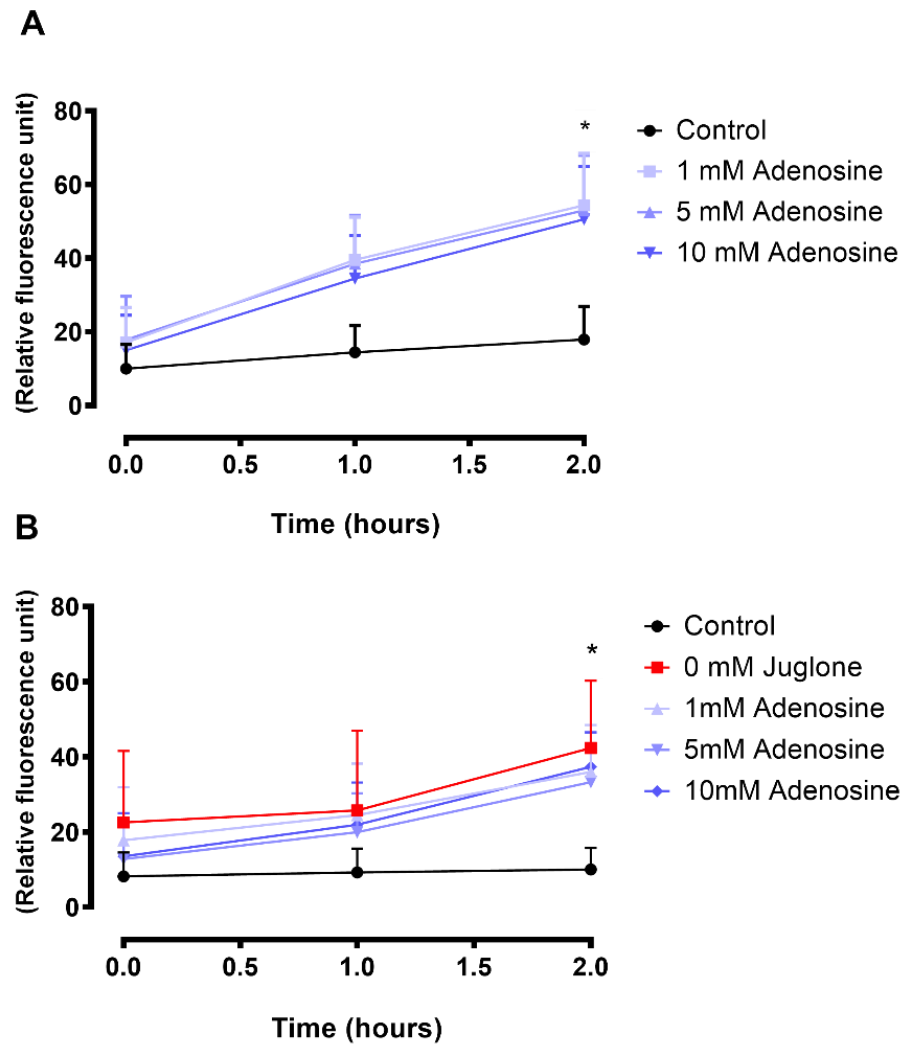
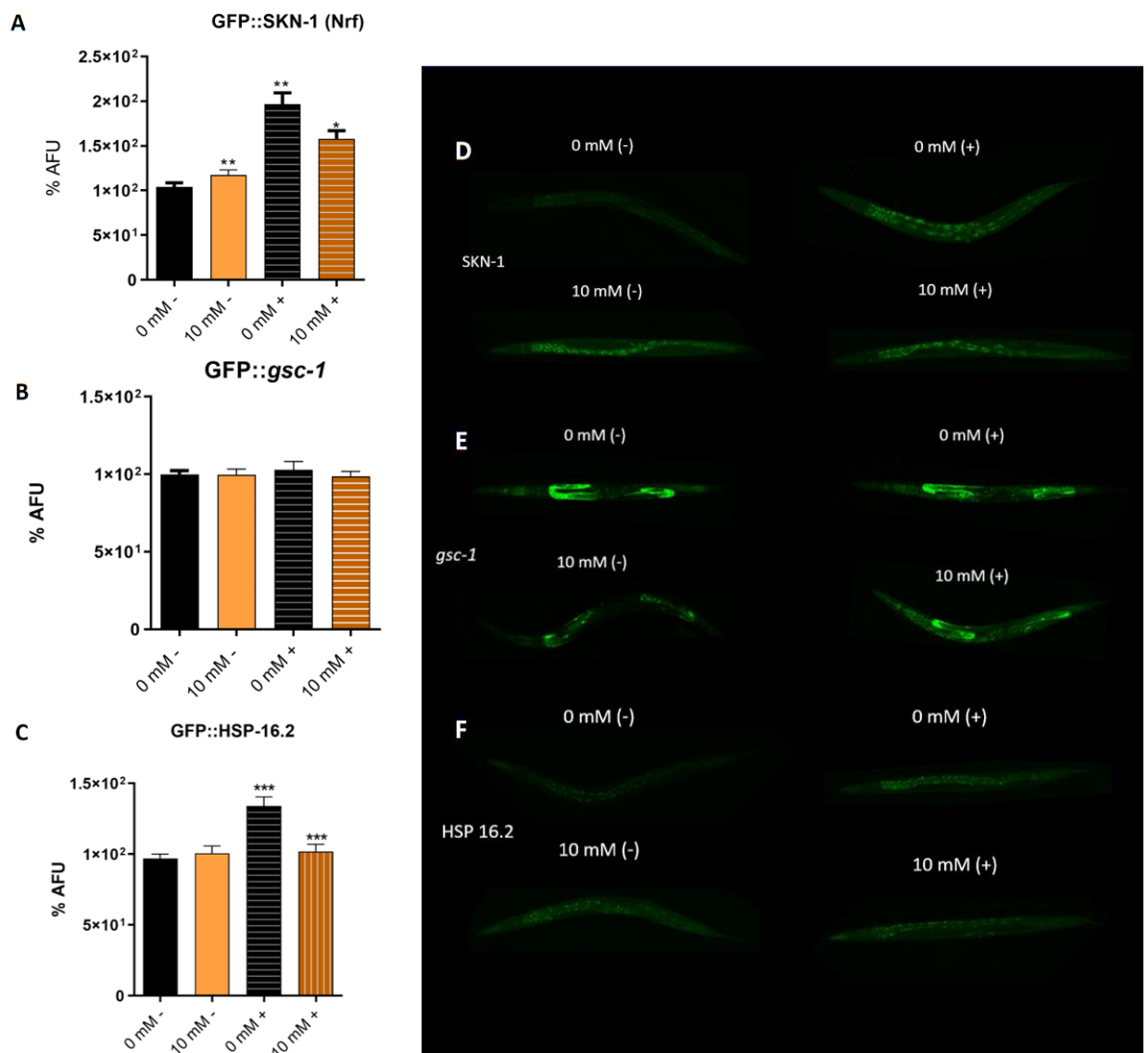


Figure 9. Effect of chronic treatment with 10 mM adenosine and thermal stress (37° C) on SKN-1 levels in LD-1 strain (A), on GSC-1 levels in LD1171 strain (B), and on HSP-16.2 levels in CL2070 strain of *C. elegans* (C). Data are expressed as means \pm S.E.M from three independent assays with 30 worms per group. Data was analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. *Indicates statistical difference from control, $p < 0.05$. The minus sign (-) represents the groups exposed to a temperature of 20°C, the (+) sign represents the groups exposed to heat at 37 °C. Confocal images of *C. elegans* (D) LD-1 mutant strains with GFP associated with SKN-1 expression. (E) LD1171 associated with *gsc-1* expression. (F) CL2070 associated with HSP 16.2 expression.



Supplementary

Figure S1. Morphological parameters by the measures of (A, J) Mean worm length (B, G) Mean worm width (C, H) Mean area in young adult larvae of the wild strain of *Caenorhabditis elegans* after acute or chronic treatment with adenosine (mM). The results were evaluated by Kruskal-Wallis with no difference in treatment compared to control mean \pm SEM, $n = 14 - 18$ worms per group. The experiments were carried out in triplicate. Effect of acute treatment with adenosine on (D, I) egg production and (E, F) egg laying by wild-type young adults *C. elegans*. One-way ANOVA Bonferroni post-test. Data are expressed as mean \pm SEM from 20 - 25 worms per group for egg production test and 20 - 30 worms per group for egg laying test. Data was analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. The experiments were performed in triplicate.

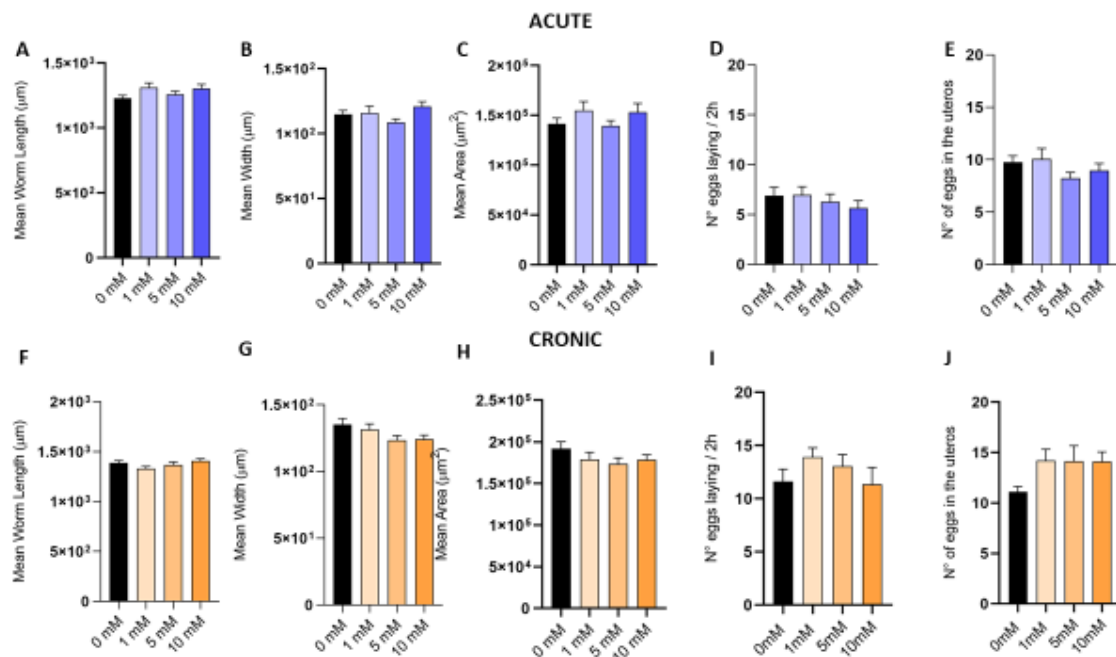
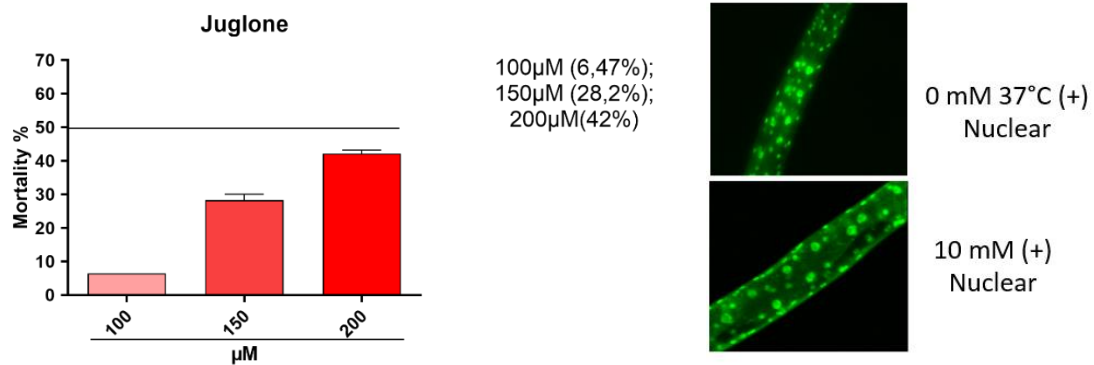


Table1. Results in percentage of localization of the DAF-16 transcription factor in 20 mutant worms per groups of the TJ353 strain. Figure 13 Representation of the location considered in the cytoplasm, intermediary or nuclear.

Groups	Location			
	Cytoplasm (%)	Intermediary (%)	Nucleus (%)	
Acute	0 mM -	75	15	10
	0 mM+	0	10	90
	1 mM+	80	20	0
	5 mM+	0	85	15
	10 mM+	0	10	90
	1 mM-	0	90	10
	5 mM-	0	95	5
	10 mM-	0	100	0
Chronic	0 mM-	90	10	0
	10mM-	0	15	85
	0 mM+	0	30	70
	10mM+	0	0	100

Figure S2: Percentage mortality of worms exposed to different concentrations of Juglone 100, 150 and 200 μ M which caused 42% mortality of worms and was the concentration used in the chemical stress induction assays.

Figure S3. DAF-16 Nuclear localization



7. Funding

Financial support for this study was provided by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS (FAPERGS), Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazilian National Institute for Science and Technology (INCT), “Programa de Apoio a Núcleos Emergentes” (PRONEM) and MCTI/CNPq [grant numbers 472669/2011-7, 475896/2012-2]. Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) process number 88882.182139/2018-01.

8. References

1. Verkhatsky, Alexei, and Geoffrey Burnstock. "Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance." *Bioessays* 36.7 (2014): 697-705;
2. Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, 52(1-2), 44-56;
3. Stone, T. W. (1985). Classification of adenosine receptors in the central nervous system. In *Methods Used in Adenosine Research* (pp. 305-316). Springer, Boston, MA;
4. Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tomé, A. R., Agostinho, P. M., & Cunha, R. A. (2011). Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(5), 1380-1399.
5. Vaz, I.M.S. (2017). Therapeutic approach to sleep disorders: recent pharmacological advances (Doctoral dissertation);

6. F. Libert, M. Parmentier, A. Lefort, C. Dinsart, J. Van Sande, C. Maenhaut, M.J. Simons, J.E. Dumont, G. Vassart, Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family, *Science* 244 (1989) 569–572;
7. Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in *Cell membrane receptors for drugs and hormones* (Bolis L and Straub RW eds) pp 107–118, Raven Press, New York;
8. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 527-552;
9. McCallion, Kevin, Denis W. Harkin, and Keith R. Gardiner. "Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature." *Critical care medicine* 32.1 (2004): 273-277;
10. Drury AN and Szent-György A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol (Lond)* 68:213–237;
11. Schulte G and Fredholm BB (2000) Human adenosine A1, A2A, A2B, and A3 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* 58:477–482;
12. Dickenson JM, Blank JL, and Hill SJ (1998) Human adenosine A1 receptor and P2Y2-purinoceptor-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in transfected CHO cells. *Br J Pharmacol* 124:1491–1499;
13. Sexl V, Mancusi G, Holler C, Gloria-Maercker E, Schutz W, and Freissmuth M (1997) Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J Biol Chem* 272:5792–5799;
14. Jonzon B and Fredholm BB (1985) Release of purines, noradrenaline and GABA from rat hippocampal slices by field stimulation. *J Neurochem* 44:217–224. Jonzon B, Nilsson J, and Fredholm BB (1985) Adenosine receptor-mediated changes in cyclic AMP production and DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 124:451–456;
15. Xie, Xin et al. The protective effect of adenosine-preconditioning on paraquat-induced damage in *Caenorhabditis elegans*. **Dose-Response**, v. 18, n. 2, p. 1559325820935329, 2020;
16. Bridi JC, Barros AG, Sampaio LR, Ferreira JC, Antunes Soares FA, Romano-Silva MA (2015) Lifespan extension induced by caffeine in *Caenorhabditis elegans* is partially dependent on adenosine signaling. *Front Aging Neurosci* 7:220. doi:10.3389/fnagi.2015.00220;
17. Machado, Marina Lopes et al. *Ilex paraguariensis* modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways. **Plos one**, v. 13, n. 9, p. e0204023, 2018;
18. Arantes, L. P. et al. Mechanisms involved in anti-aging effects of guarana (*Paullinia*

- cupana) in *Caenorhabditis elegans*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, 2018;
19. Manalo, Rafael VM; Medina, Paul. Caffeine protects dopaminergic neurons from dopamine-induced neurodegeneration via synergistic adenosine-dopamine D2-like receptor interactions in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 137, 2018;
20. Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 100(1), 64-119;
21. Helmcke, K. J., Avila, D. S., & Aschner, M. (2010). Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research. *Neurotoxicology and teratology*, 32(1), 62-67;
22. Brenner, Sydney. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974;
23. Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology*, 51(1), 23-33;
24. Lewis, J. A., & Fleming, J. T. (1995). Basic culture methods. *Methods in cell biology*, 48, 3-29;
25. Schafer, J. C., Winkelbauer, M. E., Williams, C. L., Haycraft, C. J., Desmond, R. A., & Yoder, B. K. (2006). IFTA-2 is a conserved cilia protein involved in pathways regulating longevity and dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cell science*, 119(19), 4088-4100;
26. Murphy, C. T., & Hu, P. J. (2018). Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet];
27. Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D. W., Mizunuma, M., Narasimhan, S. D., Neumann-Haefelin, E., ... & Blackwell, T. K. (2012). TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell metabolism*, 15(5), 713-724;
28. Polli, J. R., Dobbins, D. L., Kobet, R. A., Farwell, M. A., Zhang, B., Lee, M. H., & Pan, X. (2015). Drug-dependent behaviors and nicotinic acetylcholine receptor expressions in *Caenorhabditis elegans* following chronic nicotine exposure. *Neurotoxicology*, 47, 27-36;
29. Roussel, N., Sprenger, J., Tappan, S. J., & Glaser, J. R. (2014, December). Robust tracking and quantification of *C. elegans* body shape and locomotion through coiling, entanglement, and omega bends. In *Worm* (Vol. 3, No. 4, p. e982437). Taylor & Francis;
30. Gubert, P., Aguiar, G. C., Mourão, T., Bridi, J. C., Barros, A. G., Soares, F. A., & Romano-Silva, M. A. (2013). Behavioral and metabolic effects of the atypical antipsychotic ziprasidone on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 8(9), e74780;
31. Stefanello, S. T., Gubert, P., Puntel, B., Mizdal, C. R., de Campos, M. M. A., Salman, S.

- M., & Soares, F. A. A. (2015). Protective effects of novel organic selenium compounds against oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology reports*, 2, 961-967;
32. Gill, M. S., A. Olsen, et al. (2003). "An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Free Radic Biol Med* 35(6): 558-565;
33. D.C. Zamberlan, et al., Diphenyl-diselenide suppresses amyloid- peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease, *Neuroscience* 278 (0) (2014);
34. da Silveira, T. L., Zamberlan, D. C., Arantes, L. P., Machado, M. L., da Silva, T. C., de Freitas Câmara, D., ... & Soares, F. A. A. (2018). Quinolinic acid and glutamatergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology*, 67, 94-101;
35. Schafer, W. R., Sanchez, B. M., & Kenyon, C. J. (1996). Genes affecting sensitivity to serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 143(3), 1219-1230;
36. Duerr, J. S., Gaskin, J., & Rand, J. B. (2001). Identified neurons in *C. elegans* coexpress vesicular transporters for acetylcholine and monoamines. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(6), C1616-C1622;
37. Franks, D. M., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Sugahara, K., & Okkema, P. G. (2006). *C. elegans* pharyngeal morphogenesis requires both de novo synthesis of pyrimidines and synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Developmental biology*, 296(2), 409-420;
38. Doncaster, C. (1962). Nematode feeding mechanisms. I. Observations on *Rhabditis* and *Pelodera*. *Nematologica* 8, 313-320.10.1163/187529262X00125;
39. Seymour, M., Wright, K., and Doncaster, C. (1983). The action of the anterior feeding apparatus of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditida). *J. Zool. Soc. London* 201, 527-539.10.1111/j.1469-7998.1983.tb05074.x;
40. Pereira L 2015 Pereira, L., Kratsios, P., Serrano-Saiz, E., Sheftel, H., Mayo, A. E., Hall, D. H. & Hobert, O. (2015). A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *Elife*, 4, e12432;
- 41.. Burnstock G, Arnett TR, Orriss IR. 2013. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. *Purinergic Signal* 9: 541–72;
42. Burnstock G. 1996. Purinoceptors: ontogeny and phylogeny. *Drug Dev Res* 39: 204–42;
43. Dal Santo, P., Logan, M.A., Chisholm, A.D., and Jorgensen, E.M. (1999). The inositol trisphosphate receptor regulates a 50- second behavioral rhythm in *C. elegans*. *Cell* 98, 757–767;
44. Avery L. and Thomas J. H. (1997) Feeding and defecation. In: *C. elegans II* (Riddle D. L., Blumenthal T., Meyer B. J. and Priess J. R.),pp. 679–719. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Press, New York;
45. McCormick, D. A., & Contreras, D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annual review of physiology*, 63(1), 815-846;

46. Croll, N.A., 1975. Components and patterns in the behaviour of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Zool.* 176, 159–176;
47. Gray, J. M., Hill, J. J., & Bargmann, C. I. (2005). A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3184-3191;
48. Chalfie, M., Sulston, J. E., White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. (1985) *J. Neurosci.* 5, 956–964;
49. White, John G. et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 314, n. 1165, p. 1-340, 1986;
50. Tiwari, S. S., Tambo, F., & Agarwal, R. (2020). Assessment of lead toxicity on locomotion and growth in a nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Applied and Natural Science*, 12(1), 36-41.33.J.F. Nahabedian et al. / *Methods* 56 (2012) 95–102;
51. Wakabayashi, T., Kitagawa, I., & Shingai, R. (2004). Neurons regulating the duration of forward locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience research*, 50(1), 103-111;
52. Pierce-Shimomura, J.T., Morse, T.M., Lockery, S.R., 1999. The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J. Neurosci.* 19, 9557–9569;
53. Zhen, M., & Samuel, A. D. (2015). *C. elegans* locomotion: small circuits, complex functions. *Current opinion in neurobiology*, 33, 117-126;
54. Cypser, J. R., Wu, D., Park, S. K., Ishii, T., Tedesco, P. M., Mendenhall, A. R., & Johnson, T. E. (2013). Predicting longevity in *C. elegans*: fertility, mobility and gene expression. *Mechanisms of ageing and development*, 134(7-8), 291-297;
55. Nahabedian, J. F., Qadota, H., Stirman, J. N., Lu, H., & Benian, G. M. (2012). Bending amplitude—A new quantitative assay of *C. elegans* locomotion: Identification of phenotypes for mutants in genes encoding muscle focal adhesion components. *Methods*, 56(1), 95-102.
56. Anderson, G. L., Cole, R. D., & Williams, P. L. (2004). Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(5), 1235-1240;
57. Cooper, Jason F. et al. Delaying aging is neuroprotective in Parkinson's disease: a genetic analysis in *C. elegans* models. **NPJ Parkinson's disease**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2015.58. Ahmad, T., & Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in oxidative stress and cell signaling. *Antioxidants*, 8(4), 91;
59. Selye, Hans. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. **Canadian Medical Association Journal**, v. 115, n. 1, p. 53, 1976.
60. Lithgow, Gordon J.; Walker, Glenda A. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. **Mechanisms of ageing and development**, v. 123, n. 7, p. 765-771, 2002;
61. Kenyon, Cynthia. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. **Cell**, v. 120,

n. 4, p. 449-460, 2005;

62. PAPAIOANNOU, Sylvana et al. Role of a FMRFamide-like family of neuropeptides in the pharyngeal nervous system of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of neurobiology**, v. 65, n. 3, p. 304-319, 2005.

63. Tullet, Jennifer MA et al. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 1025-1038, 2008;

64. Xu, Changjiang; LI, Christina Yong-Tao; KONG, Ah-Ng Tony. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of pharmacal research**, v. 28, n. 3, p. 249-268, 2005;

65. Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiol. Rev.* 86, 1179–1236.;

66. Jasper, Heinrich. SKN worms and long life. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 915-916, 2008;

67. Schafer, W. R., & Kenyon, C. J. (1995). A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 375(6526), 73-78;

68. Bowerman, B., Eaton, B. A., & Priess, J. R. (1992). *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell*, 68(6), 1061-1075;

69. Bowerman, B., Draper, B. W., Mello, C. C., & Priess, J. R. (1993). The maternal gene *skn-1* encodes a protein that is distributed unequally in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 74(3), 443-452;

70. An, J.H. and Blackwell, T.K. 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal are part of a functional signalling system for proliferation and differentiation of human.;

71. An JH, Vranas K, Lucke M, Inoue H, Hisamoto N, Matsumoto K, Blackwell TK (2005) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16275–16280;

72. Inoue H, Hisamoto N, An JH, Oliveira RP, Nishida E, Blackwell TK, Matsumoto K (2005) The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev.* 19, 2278–2283;

73. Murphy, Coleen T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-283, 2003;

74. Kenyon, Cynthia; Murphy, Coleen T. Enrichment of regulatory motifs upstream of predicted DAF-16 targets. **Nature genetics**, v. 38, n. 4, p. 397-398, 2006;

75. Oh, Seung Wook et al. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. **Nature genetics**, v. 38, n. 2, p. 251-257, 2006;

76. Dong MQ, Venable JD, Au N, Xu T, Park SK, Cociorva D, Johnson JR, Dillin A, Yates JR III (2007) Quantitative mass spectrometry identifies insulin signaling targets in *C. elegans*. *Science* 317, 660–663;
77. McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Thomas JH, Patel DS, Selman C, Withers DJ, Thornton JM, Partridge L, Gems D (2007) Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol.* 8, R132;
78. Samuelson AV, Carr CE, Ruvkun G (2007) Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants. *Genes Dev.* 21, 2976–2994;
79. Fernandez, Robert W. et al. Cellular expression and functional roles of all 26 neurotransmitter GPCRs in the *C. elegans* egg-laying circuit. *Journal of Neuroscience*, v. 40, n. 39, p. 7475-7488, 2020.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho contribui para a compreensão da ação fisiológica da adenosina no nematoide *Caenorhabditis elegans*. O comportamento reprodutivo do verme demonstra um leve aumento na produção e postura de ovos, mas não é estatisticamente diferente do grupo controle. A adenosina promoveu retardo no ritmo de defecação, sugestivo à uma possível interação com os canais de cálcio presentes no intestino. A adenosina modula a coordenação muscular da faringe e possivelmente neurotransmissores como Ach, serotonina e GABA, e essa interação pode estar relacionada ao aumento do bombeamento da faringe. Também observamos modulação independente do tempo e da concentração, na musculatura envolvida na regulação do comportamento locomotor, o tratamento agudo com adenosina aumentou alguns comportamentos locomotores e enquanto o tratamento crônico diminuiu os mesmos comportamentos demonstrando. A adenosina parece estar envolvida com a migração do fator de transcrição DAF-16 para o núcleo e modula a HSP 16.2, no entanto, não observamos efeito antioxidante quando o animal foi exposto a condições de estresse químico ou térmico e também não houve redução da produção de EROs sob condições basais ou induzidas. A adenosina não aumentou os níveis de *gsc-1* mas, modulou os níveis de SKN-1 após estresse térmico. Nosso trabalho demonstra pela primeira vez, um estudo no modelo experimental *C. elegans*, utilizando adenosina exógena em tratamento agudo e crônico avaliando a fisiologia e parâmetros bioquímicos.

6 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, mais estudos tornam-se necessários para elucidar o comportamento de *C. elegans* e os efeitos da adenosina, *per se* ou sob condições de estresse. É necessário investigar também como o Sistema de Sinalização Purinérgica e as vias que parecem ativas como DAF-16 e SKN-1 interferem no desenvolvimento e na vida do verme e a interação com o sistema colinérgico.

7 BIBLIOGRAFIA

ABBRACCHIO, Maria P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.

ABBRACCHIO, Maria P.; BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 113-145, 1998.

ACCILI, Domenico; ARDEN, Karen C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 421-426, 2004.

AHMAD, Taseer; SUZUKI, Yuichiro J. Juglone in oxidative stress and cell signaling. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 91, 2019.

AN, Jae Hyung et al. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 45, p. 16275-16280, 2005.

AN, Jae Hyung; BLACKWELL, T. Keith. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. **Genes & development**, v. 17, n. 15, p. 1882-1893, 2003.

ANDERSON, Gary L.; COLE, Russell D.; WILLIAMS, Phillip L. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 23, n. 5, p. 1235-1240, 2004.

ARANTES, L. P. et al. Mechanisms involved in anti-aging effects of guarana (*Paullinia cupana*) in *Caenorhabditis elegans*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, 2018.

are part of a functional signalling system for proliferation and differentiation of human.

ASHRAFI, Kaveh et al. Effects of *Caenorhabditis elegans* *sgk-1* mutations on lifespan, stress resistance, and DAF-16/FoxO regulation. 2013.

BANSAL, Ankita et al. Transcriptional regulation of *Caenorhabditis elegans* FOXO/DAF-16

modulates lifespan. **Longevity & healthspan**, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2014.

BAVAN, Selvan et al. A P2X receptor from the tardigrade species *Hypsibius dujardini* with fast kinetics and sensitivity to zinc and copper. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

BERDICHEVSKY, Ala et al. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1165-1177, 2006.

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

BRENNER, Sydney. The worm's turn. **Current Biology**, v. 12, n. 21, p. R713, 2002.

BRIDI, Jessika Cristina et al. Lifespan extension induced by caffeine in *Caenorhabditis elegans* is partially dependent on adenosine signaling. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, p. 220, 2015.

BRUNET, Anne et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **cell**, v. 96, n. 6, p. 857-868, 1999.

BRUNET, Anne et al. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 3, p. 952-965, 2001.

BURNSTOCK, G. et al. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. **British journal of pharmacology**, v. 40, n. 4, p. 668-688, 1970.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmac. Rev.* 24, 509-581. CELANDER, O. & FOLKOW, B.(1953a). The nature and distribution of afferent fibres provided with the axon reflex arrangement. **Acta. physiol. scand**, v. 29, p. 359-370, 1972.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. **Acta physiologica**, v. 195, n. 4, p. 415-447, 2009.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31-304, 2004.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. **Cell death & disease**, v. 1, n. 1, p. e9-e9, 2010.

BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signalling-an overview. In: **Novartis Foundation symposium**. Chichester; New York; John Wiley; 1999, 2006. p. 26.

BURNSTOCK, Geoffrey; B FREDHOLM, Bertil; VERKHRATSKY, Alexei. Adenosine and

ATP receptors in the brain. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 8, p. 973-1011, 2011.

Cancer Lett. **174**: 103–113.

CHEN, Albert Tzong-Yang et al. Longevity genes revealed by integrative analysis of isoform-specific daf-16/FoxO mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 613-629, 2015.

CHEN, Jiang-Fan et al. A2A adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9192-9200, 1999.

CHEN, Jiang-Fan et al. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. RC143-RC143, 2001.

CHRISTENSEN, Ryan et al. A conserved PTEN/FOXO pathway regulates neuronal morphology during *C. elegans* development. **Development**, v. 138, n. 23, p. 5257-5267, 2011.

CLAYTON, Peter E. et al. Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 11-24, 2011.

COOPER, Jason F. et al. Delaying aging is neuroprotective in Parkinson's disease: a genetic analysis in *C. elegans* models. **NPJ Parkinson's disease**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2015. Ahmad, T., & Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in oxidative stress and cell signaling. *Antioxidants*, 8(4), 91.

COOPER, Jason F. et al. Delaying aging is neuroprotective in Parkinson's disease: a genetic analysis in *C. elegans* models. **NPJ Parkinson's disease**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2015.

CORNILS, Astrid et al. Specific insulin-like peptides encode sensory information to regulate distinct developmental processes. **Development**, v. 138, n. 6, p. 1183-1193, 2011.

CORSI, Ann K.; WIGHTMAN, Bruce; CHALFIE, Martin. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry international**, v. 38, n. 2, p. 107-125, 2001.

CYPSER, James R. et al. Predicting longevity in *C. elegans*: fertility, mobility and gene expression. **Mechanisms of ageing and development**, v. 134, n. 7-8, p. 291-297, 2013.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813–824, 2007.

DE TORRE-MINGUELA, C. et al. Extracellular ATP acting as a danger signal activates the P2X7 receptor in macrophages for the release of a specific secretome. In: **European Journal of Immunology**. 111 river st, hoboken 07030-5774, nj usa: wiley-blackwell, 2016. p. 437-437.

DIMITRIADI, Maria; HART, Anne C. Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Neurobiology of disease**, v. 40, n. 1, p. 4-11, 2010.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. v. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart 1. *The Journal of physiology*, v. 68, n. 3, p. 213-237, 1929.

DU, Xiaocui et al. Low concentrations of caffeine and its analogs extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by modulating IGF-1-like pathway. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 10, p. 211, 2018.

ELLMAN, G. L. et al. 1961 A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *J Invest Dermatol* 120:1007–1015

ESPELT, Maria V. et al. Oscillatory Ca²⁺ signaling in the isolated *Caenorhabditis elegans* intestine: role of the inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor and phospholipases C β and γ . **The Journal of general physiology**, v. 126, n. 4, p. 379-392, 2005.

EVANS, Eric A.; KAWLI, Trupti; TAN, Man-Wah. *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000175, 2008.

FÉLIX, Marie-Anne; BRAENDLE, Christian. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. **Current biology**, v. 20, n. 22, p. R965-R969, 2010.

FERNANDEZ, Robert W. et al. Cellular expression and functional roles of all 26 neurotransmitter GPCRs in the *C. elegans* egg-laying circuit. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 39, p. 7475-7488, 2020.

FOUNTAIN, Samuel J.; BURNSTOCK, Geoffrey. An evolutionary history of P2X receptors. **Purinergic signalling**, v. 5, n. 3, p. 269-272, 2009.

FREDHOLM, Bertil B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 527-552, 2001.

FRIEDMAN, David B.; JOHNSON, Thomas E. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. **Genetics**, v. 118, n. 1, p. 75-86, 1988.

FRIEDMAN, Jonathan R. et al. ER tubules mark sites of mitochondrial division. **Science**, v. 334, n. 6054, p. 358-362, 2011.

GILMAN, A. G. et al. Drugs used in the treatment of asthma, **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Vol. 1. 1991.

GREER, Eric L. et al. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. **Current biology**, v. 17, n. 19, p. 1646-1656, 2007.

GREER, Eric L.; BRUNET, Anne. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7410-7425, 2005.

HALLIWELL, B. Gutteridge. JMC (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed. Oxford University Press: New York, NY, USA.

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **Journal of neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, Barry. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide?. **Trends in biochemical sciences**, v. 31, n. 9, p. 509-515, 2006.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL, Berry. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochemical Society Transactions**, v. 24, n. 4, p. 1023-1027, 1996.

HANNENHALLI, Sridhar; KAESTNER, Klaus H. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 4, p. 233-240, 2009.

HARTL, F. Ulrich; BRACHER, Andreas; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324-332, 2011.

HERNDON, Laura A. et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. **Nature**, v. 419, n. 6909, p. 808-814, 2002.

HERTWECK, Maren; GÖBEL, Christine; BAUMEISTER, Ralf. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. **Developmental cell**, v. 6, n. 4, p. 577-588, 2004.

HOBERT, Oliver. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. **WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]**, 2018.

HONDA, Yoko; TANAKA, Masashi; HONDA, Shuji. Modulation of longevity and diapause by redox regulation mechanisms under the insulin-like signaling control in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 6, p. 520-529, 2008.

HOUTHOOFD, Koen et al. Metabolism, physiology and stress defense in three aging Ins/IGF-1 mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Aging cell**, v. 4, n. 2, p. 87-95, 2005.

HUANG, Haojie; TINDALL, Donald J. Dynamic FoxO transcription factors. **Journal of cell science**, v. 120, n. 15, p. 2479-2487, 2007.

INOUE, Hideki et al. The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. **Genes & development**, v. 19, n. 19, p. 2278-2283, 2005.

ITOH, Ken et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes & development**, v. 13, n. 1, p. 76-86, 1999.

- JASPER, Heinrich. SKNy worms and long life. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 915-916, 2008.
- KAESTNER, Klaus H.; KNÖCHEL, Walter; MARTÍNEZ, Daniel E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. **Genes & development**, v. 14, n. 2, p. 142-146, 2000.
- KENYON, Cynthia et al. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. **Nature**, v. 366, n. 6454, p. 461-464, 1993.
- KENYON, Cynthia; MURPHY, Coleen T. Enrichment of regulatory motifs upstream of predicted DAF-16 targets. **Nature genetics**, v. 38, n. 4, p. 397-398, 2006.
- KODAMA, Eiji et al. Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *C. elegans*. **Genes & development**, v. 20, n. 21, p. 2955-2960, 2006.
- KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.
- KRAMER, Jamie M. et al. Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. **BMC developmental biology**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2003.
- KWON, Eun-Soo et al. A new DAF-16 isoform regulates longevity. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 498-502, 2010.
- LARSEN, Pamela L. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 19, p. 8905-8909, 1993.
- LEE, Raymond YN; HENCH, Jürgen; RUVKUN, Gary. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway. **Current Biology**, v. 11, n. 24, p. 1950-1957, 2001.
- LEHTINEN, Maria K. et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 987-1001, 2006.
- LI, Ji et al. The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental biology**, v. 301, n. 1, p. 82-91, 2007.
- LIBERT, Frederick et al. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. **Science**, v. 244, n. 4904, p. 569-572, 1989.
- LIN, Kui et al. *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 278, n. 5341, p. 1319-1322, 1997.
- LIN, Kui et al. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. **Nature genetics**, v. 28, n. 2, p. 139-145, 2001.
- LITHGOW, Gordon J.; WALKER, Glenda A. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. **Mechanisms of ageing and development**, v. 123, n. 7, p. 765-771, 2002.

- KENYON, Cynthia. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 449-460, 2005.
- MACHADO, Marina Lopes et al. *Ilex paraguariensis* modulates fat metabolism in *Caenorhabditis elegans* through purinergic system (ADOR-1) and nuclear hormone receptor (NHR-49) pathways. **Plos one**, v. 13, n. 9, p. e0204023, 2018.
- MANALO, Rafael VM; MEDINA, Paul. Caffeine protects dopaminergic neurons from dopamine-induced neurodegeneration via synergistic adenosine-dopamine D2-like receptor interactions in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in neuroscience**, v. 12, p. 137, 2018.
- MCCALLION, Kevin; HARKIN, Denis W.; GARDINER, Keith R. Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature. **Critical care medicine**, v. 32, n. 1, p. 273-277, 2004.
- MORIMOTO, Richard I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & development**, v. 12, n. 24, p. 3788-3796, 1998.
- MORRIS, Jason Z.; TISSENBAUM, Heidi A.; RUVKUN, Gary. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 536-539, 1996.
- MURPHY, Coleen T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-283, 2003.
- MURPHY, Coleen T. et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 424, n. 6946, p. 277-283, 2003.
- NAHABEDIAN, John F. et al. Bending amplitude—A new quantitative assay of *C. elegans* locomotion: Identification of phenotypes for mutants in genes encoding muscle focal adhesion components. **Methods**, v. 56, n. 1, p. 95-102, 2012.
- NASS, R.; BLAKELY, R.B. The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: Opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 521-544, 2003.
- NORTH, R. Alan; VERKHRATSKY, Alexei. Purinergic transmission in the central nervous system. **Pflügers Archiv**, v. 452, n. 5, p. 479-485, 2006.
- OGG, Scott et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 994-999, 1997.
- OH, Seung Wook et al. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. **Nature genetics**, v. 38, n. 2, p. 251-257, 2006.
- OH, Seung Wook et al. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 12, p. 4494-4499, 2005.

PANKRATOV, Yuri et al. Vesicular release of ATP at central synapses. **Pflügers Archiv**, v. 452, n. 5, p. 589-597, 2006.

PARADIS, Suzanne et al. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Genes & development**, v. 13, n. 11, p. 1438-1452, 1999.

PARADIS, Suzanne; RUVKUN, Gary. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. **Genes & development**, v. 12, n. 16, p. 2488-2498, 1998.

PIERCE, Sarah B. et al. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. **Genes & development**, v. 15, n. 6, p. 672-686, 2001.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signalling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, n. 3, p. 133-40, 2003.

RAND, J.B.; JOHNSON, C.D. Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*. **Methods Cell Biology**, v. 48, p. 187–204, 1995.

RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, 2005.

ROBIDA-STUBBS, Stacey et al. TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 713-724, 2012.

RUDOLPHI, Karl A. et al. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. **Trends in pharmacological sciences**, v. 13, p. 439-445, 1992.

SCHUSTER, Eugene et al. DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 1, p. 399, 2010.

SELYE, Hans. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. **Canadian Medical Association Journal**, v. 115, n. 1, p. 53, 1976.

SENGCHUK, Megan M.; DUES, Dylan J.; VAN RAAMSDONK, Jeremy M. Measuring oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: paraquat and juglone sensitivity assays. **Bio-protocol**, v. 7, n. 1, 2017.

SIES, Helmut. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SIES, Helmut. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S31-S38, 1991.

SREEDHARAN, Smitha et al. Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2010.

TANIGUCHI, Cullen M.; EMANUELLI, Brice; KAHN, C. Ronald. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 2, p. 85-96, 2006.

TULLET, Jennifer MA et al. DAF-16/FoxO directly regulates an atypical AMP-activated protein kinase gamma isoform to mediate the effects of insulin/IGF-1 signaling on aging in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS genetics**, v. 10, n. 2, p. e1004109, 2014.

TULLET, Jennifer MA et al. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 1025-1038, 2008.

VANFLETEREN, Jacques R. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Journal**, v. 292, n. 2, p. 605-608, 1993.

VERKHRATSKY, Alexei; BURNSTOCK, Geoffrey. Biology of purinergic signalling: its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. **Bioessays**, v. 36, n. 7, p. 697-705, 2014.

VOLOVIK, Yuli et al. Differential regulation of the heat shock factor 1 and DAF-16 by neuronal *nhl-1* in the nematode *C. elegans*. **Cell reports**, v. 9, n. 6, p. 2192-2205, 2014.

WANG, John; KIM, Stuart K. Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. 2003.

WB, Brenner S. Wood. The nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 1, n. 988, p. 1091-1105, 1988.

WEBSTER, Roy (Ed.). **Neurotransmitters, drugs and brain function**. John Wiley & Sons, 2001.

WEIGEL, Detlef et al. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. **Cell**, v. 57, n. 4, p. 645-658, 1989.

WEINKOVE, David et al. Long-term starvation and ageing induce AGE-1/PI 3-kinase-dependent translocation of DAF-16/FOXO to the cytoplasm. **Bmc Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2006.

WHITE, J. G. et al. 1976 The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 275, n. 938, p. 327-348, 1976. ISSN 0962- 8436.

WHITE, John G. et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 314, n. 1165, p. 1-340, 1986.

WILSON, Mark A. et al. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging cell**, v. 5, n. 1, p. 59-68, 2006.

WOLKOW, Catherine A. et al. Insulin receptor substrate and p53 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* *daf-2*/insulin-like signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49591-49597, 2002.

XIE, Xin et al. The protective effect of adenosine-preconditioning on paraquat-induced damage

in *Caenorhabditis elegans*. **Dose-Response**, v. 18, n. 2, p. 1559325820935329, 2020.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

ZHOU, Qun-Yong et al. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 16, p. 7432-7436, 1992.

ZHU, Bangfu et al. Functional analysis of epilepsy-associated variants in STXBP1/Munc18-1 using humanized *Caenorhabditis elegans*. **Epilepsia**, v. 61, n. 4, p. 810-821, 2020.

ZIMMERMANN, Herbert. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.